



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA



**Efecto de consorcios microbianos aerobios en la
biorremediación de suelo contaminado con aceite residual
automotriz en la provincia de Chiclayo**

TESIS

Para Optar el Título Profesional de Licenciado (a) en
Biología - Microbiología - Parasitología

PRESENTADA POR:

Br. Denner Kilder Cabrejos Ramírez

Br. Sandra Lisbeth Sipión Díaz

LAMBAYEQUE, PERÚ

2019

Efecto de consorcios microbianos aerobios en la biorremediación de
suelo contaminado con aceite residual automotriz en la provincia de
Chiclayo

TESIS

Para Optar el Título Profesional de Licenciado (a) en
Biología - Microbiología - Parasitología

APROBADA POR

Dr. Eduardo Julio Tejada Sánchez

PRESIDENTE

Mblga. María Teresa Silva García

SECRETARIA

Dr. César Espinoza García

VOCAL

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

ASESORA

LAMBAYEQUE. PERÚ

2019

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Problema	2
1.2.	Hipótesis	2
1.3.	Objetivo general	2
1.4.	Objetivos específicos	3
II.	MARCO TEÓRICO	4
2.1.	Antecedentes de la investigación	4
2.2.	Base teórica	6
2.2.1.	Biorremediación	7
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1.	Materiales	10
3.1.1.	Material biológico	10
3.1.2.	Población y muestra	10
3.2.	Métodos	10
3.2.1.	Variables	10
3.2.2.	Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	11
3.2.3.	Primera etapa	15
3.2.4.	Segunda etapa: Biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz	20
3.3.	Análisis estadístico de los datos	23
IV.	RESULTADOS	24
4.1.	Características del suelo contaminado con aceite residual automotriz	24
4.2.	Consortios de microorganismos hidrocarbonoclasticos seleccionados en los microcosmos con menor toxicidad	24
4.3.	Comparación del efecto de tres consorcios microbianos aerobios en la biorremediación de suelo contaminado	36
V.	DISCUSIÓN	46
VI.	CONCLUSIONES.....	51
VII.	RECOMENDACIONES	52
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Área contaminada con aceite residual automotriz y nivel de fitotoxicidad del suelo de los talleres de reparación de vehículos terrestres y centros de expendio de aceite automotriz en la provincia de Chiclayo, 2018	27
Tabla 2. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz al momento del establecimiento del microcosmos	28
Tabla 3. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 10 días en microcosmos	29
Tabla 4. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 20 días en microcosmos	30
Tabla 5. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 30 días en microcosmos	31
Tabla 6. Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz al momento del establecimiento del microcosmos	32
Tabla 7. Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 10 días en microcosmos	33
Tabla 8. Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 20 días en microcosmos	34
Tabla 9. Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 30 días en microcosmos	35
Tabla 10. Características del suelo de tres microcosmos seleccionados a los 30 días	37
Tabla 11. Cultivos de microorganismos hidrocarbonoclasticos aerobios aislados de microcosmos seleccionados	3
Tabla 12. Géneros identificados en consorcios de microorganismos hidrocarbonoclasticos aerobios	38

Tabla 13. Características químicas y microbiológicas del suelo contaminado con aceite residual automotriz en Lambayeque, 2018	40
Tabla 14. Nivel de toxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz en Lambayeque, 2018	41
Tabla 15. Características del suelo contaminado con aceite residual automotriz al momento del establecimiento del microcosmos en la etapa de biorremediación	41
Tabla 16. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz durante 90 días de biorremediación	42
Tabla 17. Índice de germinación de <i>Raphanus sativus</i> L. y nivel de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz durante 90 días de biorremediación	43
Tabla 18. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de las medias del índice de germinación de <i>Raphanus sativus</i> L. durante la biorremediación de suelo contaminado	44
Tabla 19. Características del suelo biorremediado con consorcio microbiano 7 más fertilizante químico	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Recolección de suelo contaminado con aceite residual automotriz en Chiclayo, Lambayeque 2018	12
Figura 2. Fragmentado de suelo contaminado con aceite residual automotriz	12
Figura 3. Suelo contaminado con aceite residual automotriz, tamizado	13
Figura 4. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos en suelo contaminado con aceite residual automotriz	15
Figura 5. Prueba de germinación de semillas de <i>Raphanus sativus</i> L.	15
Figura 6. Semillas de <i>Raphanus sativus</i> L. germinadas en suelo contaminado con aceite residual automotriz	17
Figura 7. Mezcla de paja de <i>Oryza sativa</i> L. y suelo contaminado con aceite residual automotriz	19
Figura 8. Microcosmos de suelo contaminado con aceite residual automotriz	19
Figura 9. Biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz en condiciones de microcosmos	21
Figura 10. Obtención del inóculo microbiano por el método de siembra a gran escala	22
Figura 11. Suelo contaminado con aceite residual automotriz en taller de reparación de vehículos terrestres en la provincia de Chiclayo, Lambayeque, 2018	25
Figura 12. Suelo contaminado en centro de expendio de aceite en Chiclayo, Lambayeque, 2018	26
Figura 13. Suelo contaminado en centro de expendio de aceite en Chiclayo, Lambayeque, 2018	26

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de tres consorcios microbianos aerobios en la biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz (ARA) en la provincia de Chiclayo. En 15 talleres de reparación de vehículos terrestres y centros de expendio se investigó la fitotoxicidad del suelo en *Raphanus sativus* L. “rabanito”. En forma independiente 5kg de suelo por triplicado se acondicionaron en microcosmos con atenuación natural y bioestimulación (10N:1P) y después de 30 días se aislaron los microorganismos de los tres microcosmos con menor fitotoxicidad. Con estos tres consorcios se comparó la biorremediación del suelo contaminado en un ensayo completamente aleatorio con cinco tratamientos: Atenuación natural (T1), fertilizante N:P (T2) y consorcios microbianos + N:P (T3 a T5), considerándose tres repeticiones por tratamiento. El suelo de los establecimientos presentó un nivel severo de fitotoxicidad. Se seleccionaron tres consorcios de microorganismos hidrocarbonoclásticos aerobios, identificándose *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Candida* spp., *Aspergillus* sp. y *Paecilomyces* sp. Los tres consorcios microbianos aceleraron e incrementaron la biorremediación del suelo contaminado con ARA, alcanzándose un nivel bajo de fitotoxicidad a los 90 días con los consorcios microbianos (T4 y T5), en comparación con un nivel severo de fitotoxicidad con el testigo (T1). La concentración inicial de aceites y grasas del suelo ($32\,119\text{ mgkg}^{-1}$) disminuyó a $4\,430\text{ mgkg}^{-1}$ con T4, alcanzándose 86,21% de eficiencia en la biorremediación.

Palabras clave: Hidrocarburos de petróleo, aceite residual automotriz, fitotoxicidad, consorcios microbianos, biorremediación

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the effect of three aerobic microbial consortiums on the bioremediation of soil contaminated with automotive residual oil (ARA) in the province of Chiclayo. In 15 land vehicle repair shops and retail centers, the phytotoxicity of the soil was investigated in *Raphanus sativus* L. "radish". Independently 5kg of soil in triplicate were conditioned in microcosms with natural attenuation and biostimulation (10N: 1P) and after 30 days the microorganisms of the three microcosms were isolated with less phytotoxicity. With these three consortia, bioremediation of the contaminated soil was compared in a completely randomized trial with five treatments: Natural attenuation (T1), fertilizer N: P (T2) and microbial consortiums + N: P (T3 to T5), considering three repetitions per treatment. The floor of the establishments presented a severe level of phytotoxicity. Three consortia of aerobic hydrocarbonoclastic microorganisms were selected, identifying *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Candida* spp., *Aspergillus* sp. and *Paecilomyces* sp. The three microbial consortia accelerated and increased the bioremediation of the soil contaminated with ARA, reaching a low level of phytotoxicity at 90 days with the microbial consortia (T4 and T5), compared to a severe level of phytotoxicity with the control (T1). The initial concentration of oils and fats in the soil ($32\,119\text{ mgkg}^{-1}$) decreased to $4\,430\text{ mgkg}^{-1}$ with T4, reaching 86,21% efficiency in bioremediation.

Key word: Oil hydrocarbons, automotive waste oil, phytotoxicity, microbial consortiums, bioremediation

I. INTRODUCCIÓN

El suelo es contaminado en diferente grado por los hidrocarburos de petróleo y derivados como el aceite lubricante, que después de ser utilizado es denominado aceite residual automotriz, ARA (Saucedo, Montaña, Márquez & Sánchez, 2016). El ARA es un residuo peligroso, mezcla de moléculas insolubles, en su mayoría (75 a 85%) hidrocarburos totales de petróleo, HTP. Es el aceite refinado del petróleo crudo o de origen sintético que ha sido utilizado en el cárter del motor de los vehículos y que durante su uso se mezcló con tierra, metales, agua y sustancias tóxicas (DIGESA, 2006).

En los talleres de reparación de vehículos terrestres se acumula el ARA; sin embargo, el problema común en estos establecimientos en el Perú (Mena, 2009), así como en otros países en vías de desarrollo (Ogumbayo, Bello & Nwagbara, 2012; Robledo, 2013; León, 2016), es que no disponen de un plan de almacenamiento de los residuos y éstos son depositados en envases no adecuados o son vertidos en forma directa en el suelo propio o cercano (Suntaxi, 2012). El ARA por su insolubilidad forma en la superficie del suelo una capa impermeable que impide el intercambio gaseoso y la actividad microbiana (Saucedo et al., 2016) y constituye una fuente de contaminación de HTP, entre los que destacan por su toxicidad los hidrocarburos aromáticos, HA (Pérez, Morales & Haza, 2016).

En el suelo de los talleres de reparación automotriz se han cuantificado 15 318 a 45 000 mg kg⁻¹ de ARA (León, 2016; Saucedo et al., 2016), 276 mg kg⁻¹ (Vineetha & Shibu, 2012) a 38 592 mg kg⁻¹ de aceites y grasas (Abdulsalam, Adefila, Bugaje & Ibrahim, 2012), 12 340 a 14 922 mg kg⁻¹ de HTP (Saucedo et al., 2016) y se han identificado hasta 30 compuestos aromáticos (Ferreira, Santos & Pessoa, 2013), predominando el naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno (Ortiz, Cram & Sommer, 2012).

La utilización de microorganismos en la biorremediación de ambientes contaminados disminuye la toxicidad y concentración del ARA y HTP

(Abdulsalam et al., 2012; Agamuthu, Tan & Fauziah, 2013; Xu et al., 2018); no obstante, la complejidad de la biorremediación radica, en que por lo general, los microorganismos individualmente degradan únicamente ciertos compuestos de hidrocarburos específicos, evidenciando una capacidad limitada para degradar todas las fracciones de hidrocarburos presentes (Yuniati, 2017). Ante esta problemática, existe la necesidad de investigar mecanismos que aceleren la degradación de los HTP, considerándose una alternativa la utilización de consorcios microbianos aerobios o tecnología de bioaumentación (Xu et al., 2018).

En el Perú y la región Lambayeque funcionan talleres de reparación de vehículos terrestres sin contar con la infraestructura requerida y en su mayoría contaminan el suelo y atmósfera como producto de sus actividades. Los microorganismos degradadores previamente caracterizados son eficientes y competitivos frente a los microorganismos propios de los lugares contaminados y cuando son inoculados en consorcios se asegura la degradación gradual y consecutiva de los contaminantes. Los consorcios microbianos caracterizados en la presente investigación formarán parte de un paquete tecnológico para la biorremediación de suelos impactados en los talleres de reparación de Lambayeque. La tecnología es de bajo costo, disminuirá la degradación del recurso suelo y posibilitará su recuperación.

En este contexto, se planteó el siguiente problema: ¿Cuál es el efecto de tres consorcios microbianos aerobios en la biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz en la provincia de Chiclayo? La hipótesis planteada fue: Los tres consorcios microbianos aerobios aceleran e incrementan la biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz en la provincia de Chiclayo, observándose disminución de la toxicidad en menor tiempo. El objetivo general de la investigación fue: Determinar el efecto de tres consorcios microbianos aerobios en la biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz en la provincia de Chiclayo.

Los objetivos específicos fueron: Caracterizar el suelo contaminado con aceite residual automotriz en los talleres de reparación de vehículos terrestres y centros de expendio en la provincia de Chiclayo, seleccionar los consorcios de microorganismos hidrocarbonoclasticos aerobios aislados en los microcosmos con menor toxicidad, identificar el género de los microorganismos en los consorcios hidrocarbonoclasticos

aislados de los tres microcosmos con menor toxicidad y comparar el efecto de tres consorcios microbianos aerobios en la biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

La biorremediación de un suelo contaminado con ARA se investigó en biorreactores aerobios conectados en paralelo con 1,5 kg de suelo contaminado. Los tratamientos fueron calor + agua (T1), agua (T2), calor + agua + consorcio *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* (T3), agua + consorcio con *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* (T4), agua + NPK + consorcio de bacterias (T5) y agua + NPK (T6). La concentración de aceites y grasas inicial fue de 29 000 a 38 592 mg kg⁻¹ y después de 70 días disminuyó en 40% (T1), 45% (T2), 51% (T3), 40% (T4), 59% (T5) y 63% (T6). El tratamiento con bioestimulación fue la mejor opción para la remediación del suelo contaminado con ARA (Abdulsalam et al., 2012).

En un suelo contaminado con residuos aceitosos intemperizados se investigó la eficiencia de la biorremediación. En el área de landfarming para el tratamiento de los contaminantes se colectaron muestras y se acondicionaron en cajas de polivinilo con capacidad de 20L. A los 0, 30 y 60 días se cuantificaron los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). En los cromatogramas se detectaron compuestos orgánicos: 5% de la fracción de gasolina (TPH GRO), 5% de diésel (TPH DRO) y 90% de lubricantes (TPH ORO). Las muestras presentaron TPH iniciales de 15,3; 19,0 y 29,2 g kg⁻¹ de suelo, alcanzándose porcentajes de biodegradación de 83,83; 71,97 y 55,28%, respectivamente. Se demostró la biorremediación de suelos impactados con residuos aceitosos (Ferreira et al., 2013).

En la biorremediación de suelo contaminado con aceite de motor utilizado y no utilizado se investigó la efectividad de los microorganismos autóctonos. En biorreactores con medio mínimo de sales y 0,5, 1 y 1,5% de aceite se inocularon los microorganismos en forma independiente y en consorcios, determinándose el porcentaje y patrón de degradación de los hidrocarburos. Se aislaron y seleccionaron *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Fluorobacterium* sp., y *Micrococcus* sp. A los 7 días *Pseudomonas* y *Rhodococcus* degradaron 60 y 80% del aceite, respectivamente y el consorcio de ambas alcanzó 88% de degradación. Se determinó la efectividad sinérgica

del consorcio bacteriano *Pseudomonas* – *Rhodococcus* spp. (Ogumbayo et al., 2012).

El efecto de la bioaumentación en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos se investigó en biopilas constituidas por suelo agrícola (5 kg), mezclado con 1,5 g de fenantreno o antraceno por kg de suelo. La bioaumentación se realizó cada 2 meses con dos cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno. Los tratamientos fueron nueve, correspondientes a: Control (T1), Biosurfactante + fenantreno (T2), Biosurfactante + bacterias + fenantreno (T3), Bacterias + fenantreno (T4), Fenantreno (T5), Biosurfactante + antraceno (T6), Biosurfactante + bacterias + antraceno (T7), Bacterias + antraceno (T8) y antraceno (T9). Los mayores porcentajes en la disminución de los aromáticos correspondieron a T3 con 90% de remoción del fenantreno a los 4 meses y 98% del antraceno a los 6 meses, demostrándose que la bioaumentación con bacterias fijadoras de nitrógeno incrementa la biodegradación del fenantreno y antraceno (Pérez, Vigueras, Gómez & Calva, 2015).

Las condiciones que influyen la degradación del ARA por *Ochrobactrum anthropi* y *Cinetobacter freundii* se demostraron en biorreactores. Se investigó la concentración del ARA (1 - 6%, v/v), inóculo (0,5 – 4%, v/v), pH inicial (6 – 8), temperatura de incubación (25 – 45°C) y velocidad de agitación constante (0 – 200 rpm). En las óptimas condiciones de 2% de ARA, 2% de inóculo, pH inicial 7,5, 37°C y 150 rpm, las bacterias en forma independiente y en consorcios degradaron 65, 58 y 80% del ARA, respectivamente, después de 21 días. Se demostró que *O. anthropi* y *C. freundii* bajo condiciones óptimas pueden biorremediar suelo contaminado con ARA (Ibrahim, 2016).

La eficiencia de la bioestimulación, bioaumentación y atenuación natural se investigó en la biodegradación del aceite Fuel n°6 (FO6). En biorreactores con 6,5 kg de suelo contaminado se agregó una solución de fertilizante (0,03% N; 0,01% P) cada 48 horas (bioestimulación), un cultivo de microorganismos hidrocarbonoclásticos una vez a la semana (bioaumentación) y agua cada 48 horas (atenuación). Transcurrido 1 año la mayor tasa de degradación (0,19 g TPH/día) se alcanzó con la bioestimulación, seguida de la atenuación natural (0,18 g TPH/día) y la bioaumentación (0,16 g TPH/día), demostrándose la eficiencia de las tecnologías investigadas para la remediación del suelo contaminado con aceite Fuel (Piñón et al., 2018).

2.2 Base teórica

En los talleres de reparación de vehículos terrestres se brindan servicios correctivos, preventivos y reparaciones en general de motores gasolineros y diésel y como producto de sus actividades acumulan los residuos peligrosos: aceites residuales, anticongelantes, líquido de frenos, filtros y baterías (DIGESA, 2006). El aceite usado o aceite residual automotriz, ARA, es todo aquel aceite lubricante (de motor, transmisión o hidráulico con base mineral o sintético) de desecho, generado a partir del momento que deja de cumplir la función inicial para la que fue obtenido (Robledo, 2013).

Lubricante es una sustancia que colocada entre dos piezas móviles no se degrada y forma una película que impide su contacto, permitiendo su movimiento incluso a elevada presión y temperatura (Robledo, 2013). Los aceites lubricantes tienen 75 a 85% de HTP constituidos por 45 - 76% de alcanos, 13 - 45% de cicloalcanos, 10 - 30% de aromáticos y 15 - 25% de aditivos (Mena, 2009). El anexo 4 del Reglamento de la Ley General de Residuos Sólidos (DS N° 057-2004/PCM) considera peligrosos a los residuos de aceites minerales no aptos para el uso al que estaban destinados (A3.2), residuos contaminados con mezclas y emulsiones de aceites y agua o de hidrocarburos y agua (A4.6), residuos con carácter explosivo (A4.8). Estos residuos tienen las características peligrosas de ser explosivos, inflamables y susceptibles de combustión espontánea como lo considera el anexo 6 del DS N° 057-2004/PCM.

Los HTP constituyen la mayoría de los componentes del petróleo crudo (Ramírez, 2014). Debido al gran número de hidrocarburos involucrados, no es práctico cuantificar cada uno de ellos; sin embargo, si es conveniente medir la cantidad total del conjunto de hidrocarburos que se encuentran en una muestra de suelo contaminado porque sirve como indicador general del tipo de contaminación (Cando, 2011). La fracción HTP se define como aquellos hidrocarburos del extracto orgánico total (EOT) pertenecientes a las fracciones saturada (F1) y aromática (F2) según el método 3611b de la EPA: US Environmental Protection Agency, 1996 (Viñas, 2005).

La comunidad microbiana desempeña un papel importante en el flujo de energía, transformación de nutrientes y reciclaje de elementos en el ambiente. La teoría de la Infalibilidad microbiana, sostiene que todo compuesto orgánico puede ser descompuesto por los microorganismos. Por tanto, los HTP pueden ser biodegradados por los

microorganismos denominados hidrocarbonoclasticos (Alexander, 1994; García & Aguirre, 2015).

El petróleo, compuesto mayoritariamente por hidrocarburos es biodegradado en aerobiosis con mayor eficiencia (Pérez et al., 2015) pero también en anaerobiosis (Villarreal, Balagurusamy, Rodríguez, Aguilar & Morlett, 2014). Los contaminantes biodegradables pueden ser transformados mediante la biorremediación, proceso que se sustenta en la capacidad metabólica de las poblaciones microbianas frente a los contaminantes (Alexander, 1994).

2.2.1 Biorremediación

La biorremediación es una tecnología basada en la biodegradación o transformación microbiana de los contaminantes para eliminarlos o transformarlos en otros productos menos peligrosos para el medio ambiente y la salud humana. La biodegradación es un proceso que se produce de forma natural y la biorremediación intenta potenciarla, mediante el uso de enzimas, estimulantes del crecimiento, bacterias, hongos o plantas para degradar, transformar, secuestrar o movilizar contaminantes orgánicos, inorgánicos o metales en el suelo, agua o aire (Izquierdo, 2013).

La aplicación de la tecnología de la biorremediación puede ser *“in situ”* y *“ex situ”*, equivalente a decir que cuando el suelo excavado se trata en el mismo emplazamiento se usa el término *“on site”* y cuando se lleva a una planta de tratamiento *“of site”* (Solanas, 2009). Las tecnologías de biorremediación se agrupan en biorremediación intrínseca y biorremediación dirigida. La biorremediación intrínseca o atenuación natural monitorizada está basada en los procesos físicos, químicos y biológicos que disminuyen la concentración de los contaminantes de forma natural, sin intervención externa (Piñón et al., 2018).

La biorremediación dirigida favorece la estimulación de las poblaciones microbianas indígenas, mediante el suministro de oxígeno, humedad óptima, nutrientes: N, P, K e incremento de la biodisponibilidad. En el caso de que las poblaciones microbianas presentes en el emplazamiento no tengan capacidad para metabolizar el contaminante o la población es tan mínima que no responde a los estimulantes se requiere la bioaumentación o la bioinoculación (Solanas, 2009).

Las tecnologías *“in situ”* consideran la estrategia de bioventeo (Bioventing) basada en el suministro de aire u oxígeno, acompañado o no del suministro de nutrientes con otros agentes estimulantes. Las tecnologías *ex situ* incluyen la tecnología de biopilas estáticas o dinámicas, según el suministro del oxígeno, compostaje y suelo resuspendido en medio líquido en biorreactores (Solanas, 2009; Anza et al., 2016).

La atenuación natural aprovecha los fenómenos que ocurren naturalmente en el ambiente, sin intervención humana, para disminuir la concentración de los nutrientes. La estimulación se basa en la adición de oxígeno, nutrientes o aditivos para mejorar las condiciones del medio y estimular a los organismos degradadores. La bioaumentación consiste en la adición de organismos con potencial para degradar contaminantes específicos o enzimas de éstos para acelerar el proceso degradativo (Quiceno & Ríos, 2014).

En la biodegradación, los alcanos lineales como C10 o C24 son los primeros en consumirse, debido a su baja hidrofobicidad. Esta característica aumenta conforme el número de carbonos en la cadena lineal, tal que los enlaces de cadenas largas (>C40) se degradan en un mayor tiempo (García & Aguirre, 2015). Los isoprenoides y los hidrocarburos cíclicos o nafténicos son degradados más lentamente que los lineales (Solanas, 2009). Respecto a los hidrocarburos monoaromáticos, BTEX, el tolueno es el de mayor consumo en aerobiosis. En el caso de los poliaromáticos, la tasa de consumo disminuye conforme aumentan los anillos aromáticos, requiriéndose 16 a 126 días para el fenantreno y 1400 días para el benzo pireno (Salleh, Ghazali, Rahman & Basri, 2003; García & Aguirre, 2015).

El cometabolismo es fundamental en la eliminación biológica de compuestos xenobióticos en el ambiente o de los compuestos resistentes a la biodegradación como los HAP. Se define como la transformación de un compuesto determinado, en presencia obligada de un sustrato durante el crecimiento o por células en reposo con ausencia del sustrato de crecimiento. El cosustrato o cometabolito no aporta energía, carbono o algún otro nutriente y por tanto no es útil para la replicación celular. Por el contrario, el sustrato de crecimiento es el donador de electrones que proporciona poder reductor y energía para el crecimiento y mantenimiento celular (García & Peralta, 2008).

La implementación de una tecnología de biorremediación requiere de etapas: i) investigación del emplazamiento en relación con los contaminantes, el tipo de suelo y el entorno, es decir caracterización físico-química del suelo, estudio geotécnico e hidrogeológico y análisis de riesgos, ii) desarrollo de ensayos de tratabilidad a escala de laboratorio, iii) desarrollo de ensayos a escala piloto e iv) implementación de la tecnología de biorremediación seleccionada (Viñas, 2005).

Los ensayos de tratabilidad tienen como objetivo determinar si un tratamiento es apropiado para la descontaminación. En la fase I se realiza la caracterización físico-química y microbiológica, se cuantifica la población microbiana degradadora de los contaminantes y su proporción respecto a la heterótrofa del suelo contaminado y se investiga si la población microbiana es metabólicamente activa o es activable en condiciones de bioestimulación. Una vez caracterizado el suelo, los contaminantes y la población microbiana, en la fase II se investigan los factores físicos-químicos y biológicos que afectan la biodegradación en ensayos de microcosmos (Ponce, 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

Suelo contaminado con aceite residual automotriz, ARA, semillas de *Raphanus sativus* L. “rabanito” y consorcios microbianos aerobios obtenidos de los suelos impactados con ARA.

3.1.2 Población y muestra

En la investigación descriptiva la población estuvo constituida por el suelo contaminado con aceite residual automotriz, ARA, de los talleres de reparación de vehículos terrestres y centros de expendio de aceite automotriz de la provincia de Chiclayo y se investigaron 15 muestras no probabilísticas de suelo colectadas durante octubre de 2018. En la investigación explicativa la población correspondió a los consorcios de microorganismos aerobios obtenidos de suelo contaminado con ARA y la muestra no probabilística y por conveniencia (Alvitres, 2010) estuvo constituida por tres consorcios microbianos aerobios seleccionados.

3.2 Métodos

3.2.1 Variables

a. Variables cuantitativas de la fase descriptiva

Características químicas del suelo

Número más probable (NMP) de microorganismos hidrocarbonoclasticos

Germinación de *Raphanus sativus*

b. Variables de la fase explicativa

1. Variable independiente

Tres consorcios microbianos aerobios

2. Variable dependiente

Biorremediación de suelo contaminando con ARA

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos etapas. En la primera etapa descriptiva la hipótesis se contrastó con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt y en la segunda fase explicativa con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA (Hernández, Fernández & Baptista, 2014). Los tratamientos fueron cinco, correspondientes a T1: Testigo (agua), T2: Fertilizante C:N:P y T3 a T5: consorcios microbianos aerobios.

3.2.3 Primera etapa

En la primera etapa de la investigación se caracterizó el suelo contaminado con ARA en 15 talleres de reparación y centros de expendio de la provincia de Chiclayo y se comparó y seleccionaron los consorcios de microorganismos hidrocarbonoclasticos aerobios obtenidos del suelo contaminado (Anexo A).

a. Muestreo y caracterización de suelo contaminado con ARA

En 15 talleres de reparación de vehículos terrestres y centros de expendio de la provincia de Chiclayo, se colectaron 180 kg de suelo contaminado con ARA, a razón de 12 kg por establecimiento (Figura 1). En el suelo se seleccionó el área contaminada, se delimitaron cuatro puntos de 1m² y con un pico se fragmentó la capa superficial (15 cm). El suelo contaminado se depositó con ayuda de una palana en sacos de polietileno y se transportó al invernadero, en Lambayeque. En este lugar, el contenido de los sacos se depositó sobre una manta de polietileno y se fragmentó (martillo), hasta su pulverización (Figuras 2, 3).

El suelo pulverizado se pasó a través de una malla (2 mm) de hilo de nylon poliéster y el tamizado se homogeneizó mediante el método de “cuarteo y amontonamiento” (Contreras & Carreño, 2018). La masa del suelo del extremo inferior derecho se mezcló cinco veces con el superior izquierdo, el inferior izquierdo con el superior derecho, el superior con el inferior y el derecho con el izquierdo. En cada cambio de posición se formó un “montón” con el suelo en cada cambio de posición y una vez homogenizadas las muestras se tomaron dos submuestras cada una de 5 kg, las que constituyeron los microcosmos para el aislamiento de los consorcios de microorganismos hidrocarbonoclasticos.

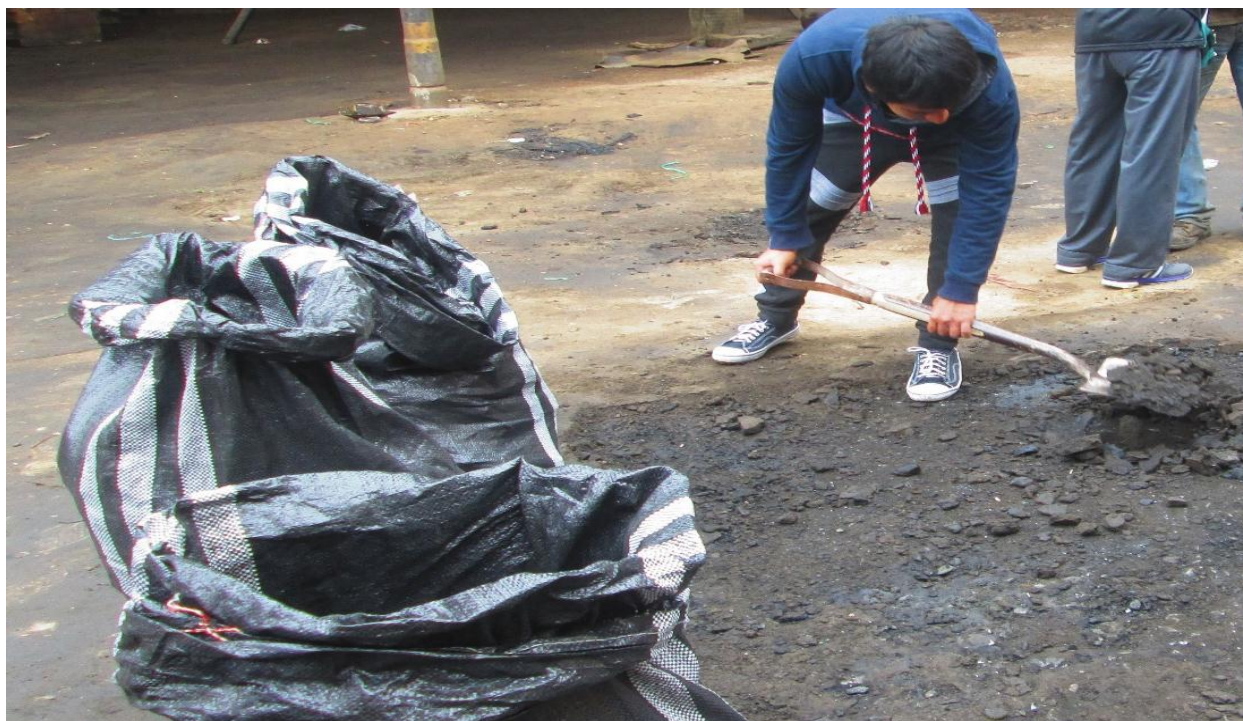


Figura 1. Recolección de suelo contaminado con aceite residual automotriz en Chiclayo, Lambayeque 2018.



Figura 2. Fragmentado de suelo contaminado con aceite residual automotriz.



Figura 3. Suelo contaminado con aceite residual automotriz, tamizado.

El suelo de cada microcosmos se homogeneizó y se colectaron seis submuestras de 10 g cada una, tres para el análisis microbiológico y tres para determinar la toxicidad de los contaminantes. El análisis microbiológico por triplicado de submuestras de 10 g consistió en determinar el número más probable (NMP g^{-1}) de microorganismos hidrocarbonoclásticos (Bento, Camargo, Okeke & Frankenberger, 2005). Las submuestras se depositaron en matraces con 90 mL de solución salina, NaCl 0,85% (p/v) obteniéndose suspensiones del suelo, con las que se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-4} .

Para determinar el número más probable de hidrocarbonoclásticos, 1 mL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} se inocularon por triplicado en tubos con 9 mL de caldo Bushnell Haas e inmediatamente después en cada tubo se vertieron 0,025 mL (25 μL) de petróleo como fuente de carbono (Figura 4, anexo B). Los tubos se incubaron a 30°C hasta por 10 días y la turbidez del medio de cultivo se consideró positivo a la presencia de microorganismos hidrocarbonoclásticos, realizándose el cálculo correspondiente (Anexo C).

La toxicidad de los contaminantes del suelo contaminado se investigó por triplicado en submuestras de 10 g (Contreras & Carreño, 2018), utilizando semillas de rabanito, a las que previamente se les determinó el porcentaje de germinación. En cuatro placas Petri con papel filtro esterilizado y humedecido con agua destilada se depositaron 25 semillas por placa, se taparon (Figura 5) y se mantuvieron a temperatura ambiente (28°C), humedeciéndolas según el requerimiento, hasta obtener el máximo de germinación después de 120 horas.

Para el ensayo de toxicidad, en la base de placas de Petri, se colocaron dos capas de papel filtro y encima las submuestras de 10 g de suelo, se agregaron 12 mL de agua destilada y en cada placa, con una pinza se depositaron 25 semillas de rabanito. Todas las placas de Petri se cubrieron con papel metálico, a temperatura ambiente (28°C) y después de 48 horas se vertieron 5 mL de agua destilada, para mantener la humedad requerida. Cada 48 horas hasta las 144 horas se contaron las semillas germinadas (Figura 6) y se midió la longitud de las radículas emergidas, retirándose en cada evaluación las semillas germinadas.

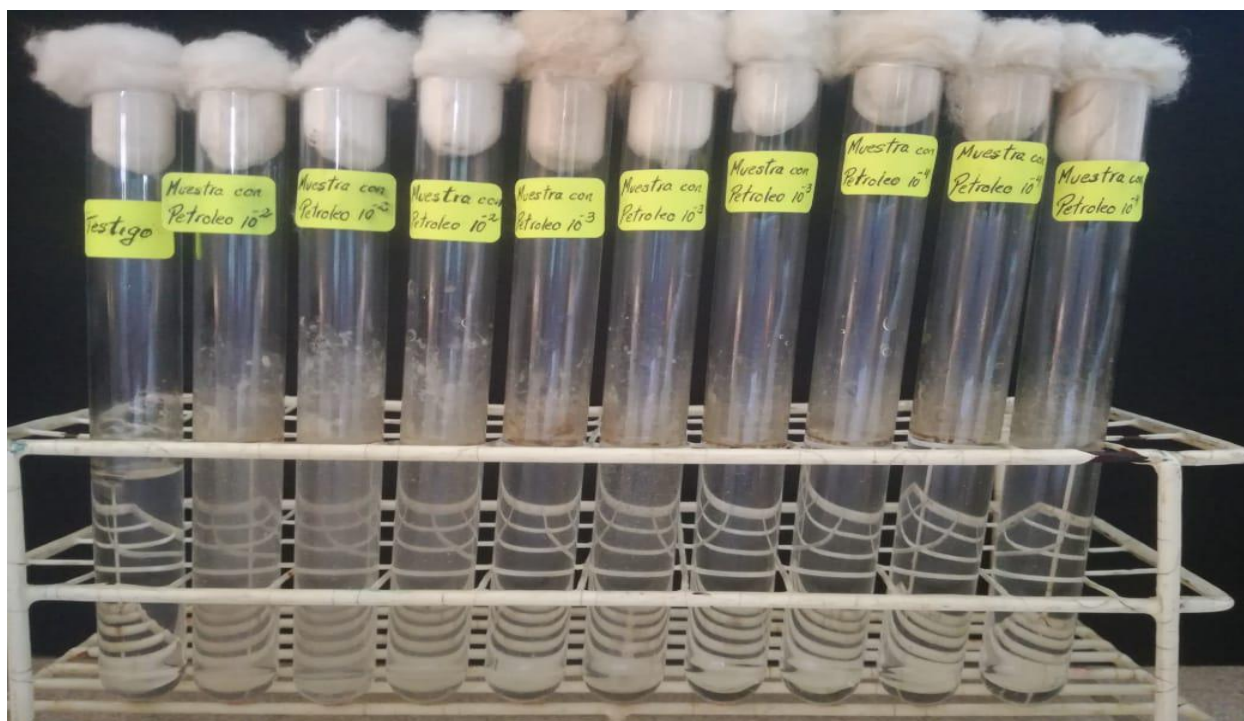


Figura 4. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos en suelo contaminado con aceite residual automotriz.

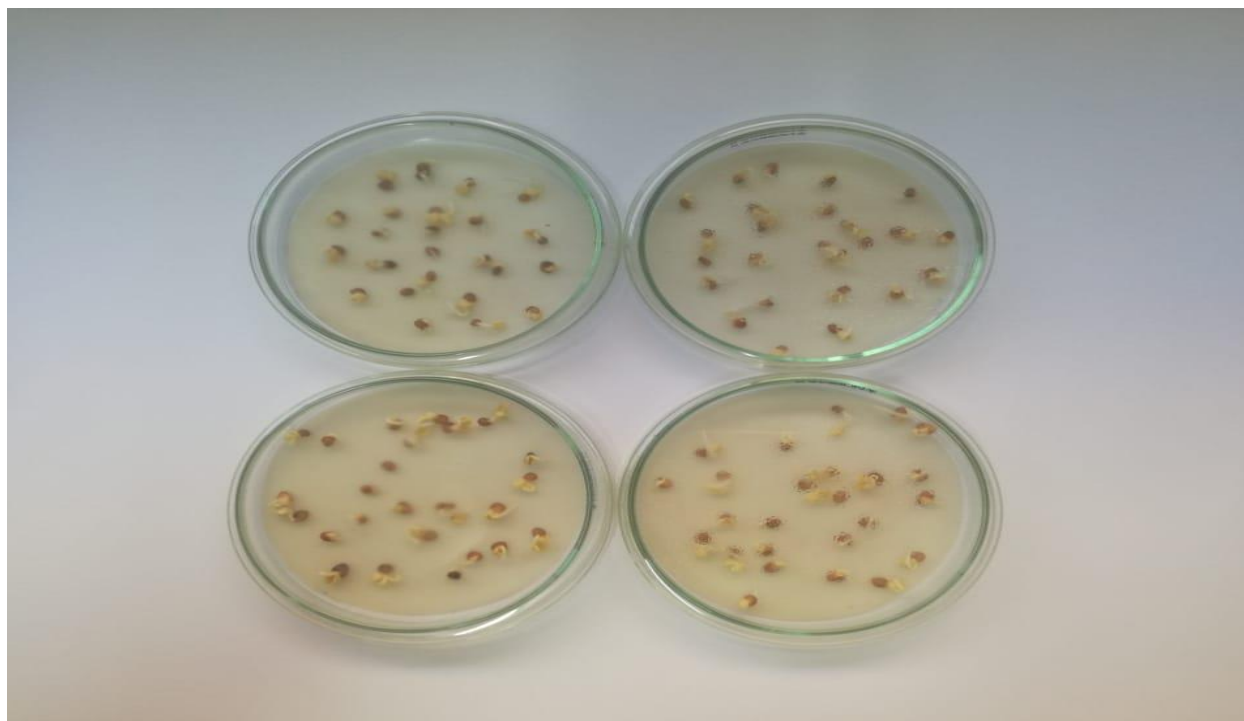


Figura 5. Prueba de germinación de semillas de *Raphanus sativus* L.

Asimismo, se calculó (Contreras & Carreño, 2018) el porcentaje relativo de germinación (PGR), crecimiento relativo de la radícula (CRR) e índice de germinación (IG):

$$PGR = \frac{\text{Número de semillas germinadas en el suelo contaminado}}{\text{Número de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

$$CRR = \frac{\text{Longitud promedio de radículas en el suelo contaminado}}{\text{Longitud promedio de radículas en el testigo}} \times 100$$

$$IG = \frac{PGR \times CRR}{100}$$

La fitotoxicidad se determinó con el criterio de interpretación (Rodríguez, 2012): $IG \geq 80\%$ indica que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración: $80\% > IG > 50\%$ se interpreta como presencia moderada de estas sustancias y un $IG \leq 50\%$ indica fuerte presencia de sustancias fitotóxicas, criterios correspondientes a niveles de fitotoxicidad bajo, moderado y severo (Contreras & Carreño, 2018).



Figura 6. Semillas de *Raphanus sativus* L. germinadas en suelo contaminado con aceite residual automotriz.

b. Obtención, selección de consorcios e identificación de microorganismos hidrocarbonoclásticos aerobios en microcosmos

Las submuestras de suelo (5 kg) en forma independiente fueron depositadas en bolsas de polietileno para ser mezcladas con 2,5 kg de pajilla de arroz (Figura 7), previamente hidratada con agua declorada durante 24 horas. La submuestra correspondiente a la bioestimulación (Benites & Flores, 2015) fue mezclada (Anexo D) con el fertilizante químico 100C:10N:1P a razón de 0,235 g de urea (46% N) y 0,004 g de fosfato diamónico (18% N, 46% P).

El suelo contaminado donde se aplicó bioestimulación y atenuación natural fue acondicionado en microcosmos edáficos constituidos por macetas de arcilla de 20 cm de diámetro por 25 cm de altura (Figura 8), en las que previamente se depositaron 1,5 kg de grava para facilitar el drenaje. Los riegos con agua potable declorada (24 horas) se realizaron en cantidad suficiente como para mantener la capacidad de campo. Transcurridos 0, 10, 20 y 30 días de incubación se colectaron cuatro submuestras de 10 g para determinar el número más probable (NMP g⁻¹) de microorganismos hidrocarbonoclásticos, así como la toxicidad en la germinación de rabanito.

El aislamiento de los microorganismos se realizó en el suelo de los tres microcosmos edáficos (bioestimulación y atenuación) con los que se obtuvo el mayor NMPg⁻¹ de microorganismos hidrocarbonoclásticos y la menor toxicidad en rabanito. En los tubos con caldo Bushnell Haas donde se realizó el recuento del NMP de hidrocarbonoclásticos se tomaron alícuotas y se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría (Benites & Flores, 2015) en agar Bushnell Haas con 1% de ARA como fuente de carbono. Después de la incubación a 30° C hasta por 10 días, las colonias de microorganismos desarrolladas se agruparon según sus características morfológicas, se seleccionó una representante de cada morfotipo, se cultivaron en caldo y agar Bushnell Haas con 1% de ARA y constituyeron los cultivos puros de microorganismos aerobios degradadores de ARA que se identificaron según sus características morfológicas y bioquímicas (Holt et al., 1999).



Figura 7. Mezcla de pajilla de *Oryza sativa* L. y suelo contaminado con aceite residual automotriz.



Figura 8. Microcosmos de suelo contaminado con aceite residual automotriz.

3.2.4 Segunda etapa: Biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz

El ensayo a escala de laboratorio se realizó en microcosmos edáficos, de manera similar a lo explicado en el ítem d, con la diferencia que los tratamientos fueron cinco, correspondientes a: Atenuación natural (T1), Fertilizante N:P (T2), Consorcio microbiano + N:P (T3), Consorcio microbiano + N:P (T4), Consorcio microbiano + N:P (T5). A cada tratamiento le correspondieron tres repeticiones totalizando 15 unidades experimentales (Figura 9, anexo D).

El inóculo microbiano definitivo mixto utilizado para los microcosmos se obtuvo por el método de siembra a gran escala (Díaz & Sánchez, 2008), trabajando con dos volúmenes de cultivo: madre y definitivo (Figura 10). Los microorganismos por triplicado se reactivaron en 4 mL de caldo Bushnell Haas con 1% de ARA, a 30 °C por 24 horas (bacterias o levaduras) a 96 horas (mohos). Para la obtención de los cultivos “madre” se tomaron 1,5 a 3 mL del caldo cultivado y se inocularon en 15 a 30 mL de caldo Bushnell Haas con 1% de ARA, incubándose a 30 °C por 24 a 96 horas. Para los cultivos “definitivos” se tomaron 15 a 30 mL de los cultivos “madre” y se incubaron en 150 a 300 mL de caldo Bushnell Haas con 1% de ARA, incubándose a 30 °C por 24 a 96 horas. El inóculo definitivo mixto se obtuvo mezclando 150 mL (de seis microorganismos) a 300 mL (de tres microorganismos) de los cultivos “madre” en un matraz de 1 L de capacidad previamente esterilizado (horno 180 °C por 2 horas) hasta completar los 900 mL requeridos para cada microcosmos.

En el ensayo se utilizaron 80 kg de suelo contaminado con ARA, perteneciente al taller 1 de reparación de vehículos terrestres. El suelo se fragmentó, pulverizó, se homogeneizó y se distribuyó (5 kg) en bolsas de polietileno. Asimismo, se obtuvo una muestra representativa de 2 kg para el análisis químico y microbiológico y la determinación de la toxicidad de los contaminantes del suelo. El análisis químico del suelo contaminado se realizó en una submuestra de 1 kg, en el Laboratorio NSF INASSA S.A.C. en Lima, determinándose la concentración de aceites y grasas y las fracciones ligera (F1), media (F2) y pesada (F3) de hidrocarburos.



Figura 9. Biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz en condiciones de microcosmos.

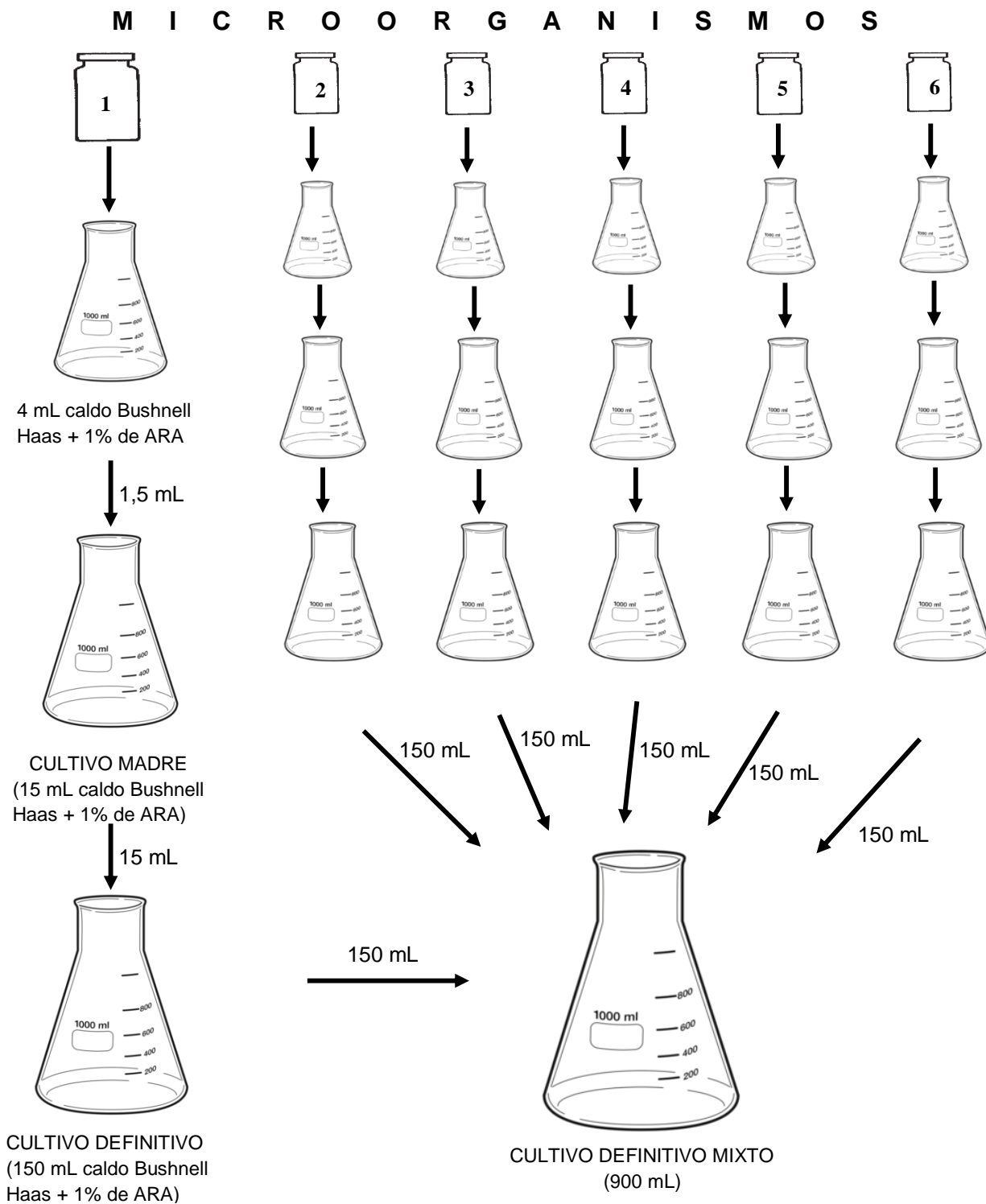


Figura 10. Obtención del inóculo microbiano por el método de siembra a gran escala.

El suelo (5 kg) distribuido en las bolsas de polietileno se mezcló con 2,5 kg de pajilla de arroz previamente hidratada con agua de clorada por 24 horas y 900 mL del inóculo definitivo mixto correspondiente en T3, T4 y T5. Después de 24 horas el suelo experimental se depositó sobre 1,5 kg de grava, acondicionados en macetas de arcilla de 20 cm de diámetro por 25 cm de altura. En T2 (Fertilizante N:P) y T3 a T5 (consorcios microbianos + N:P) se agregó el fertilizante químico 10N:1P a razón de 0,067 g de urea (46% N) y 0,007 g de fosfato diamónico (18% N, 46% P) y se mezcló con una palaneta de mano. A los 0, 30, 60 y 90 días en los microcosmos se tomaron submuestras de 40 g de suelo para determinar el NMP de microorganismos hidrocarbonoclasticos (10 g) y la toxicidad en la germinación de semillas de rabanito (30 g). En el tratamiento con la menor toxicidad a los 90 días se cuantificaron los aceites y grasas (mg/kg) en el Laboratorio NSF INASSA S.A.C. en Lima y se calculó la remoción en porcentaje (Contreras & Carreño, 2018).

La eficiencia (%) de la biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo del tratamiento con el que se alcanzó el mayor índice de germinación y menor nivel de toxicidad, se calculó mediante la fórmula utilizada por Contreras y Carreño (2018):

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{Aceites y grasas inicial} - \text{Aceites y grasas final}}{\text{Aceites y grasas inicial}} \times 100$$

3.3 Análisis estadístico de los datos

Los valores obtenidos en la investigación fueron ordenados en tablas y figuras. Se realizó el análisis de varianza de los valores promedios del índice de germinación y la superioridad entre los tratamientos se determinó mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05 (Hernández et al., 2014), utilizando los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2013.

IV. RESULTADOS

4.1 Características del suelo contaminado con aceite residual automotriz

En los talleres de reparación de vehículos terrestres y centros de expendio de aceite automotriz investigados en la provincia de Chiclayo se observó contaminación del suelo con aceite residual (ARA) en el 30 a 80% del área de los establecimientos (Figuras 11 a 13, tabla 1). En los suelos contaminados con ARA los Índices de germinación (IG) de las semillas de *Raphanus sativus* L. “rabanito” fueron de 0 a 4,24%, valores correspondientes a un nivel severo de fitotoxicidad.

4.2 Consorcios de microorganismos hidrocarbonoclasticos seleccionados en los microcosmos con menor toxicidad

El número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos en los suelos contaminados con ARA osciló entre $7,2 \times 10^2$ a $3,5 \times 10^3$ NMP g⁻¹. Estos microorganismos se incrementaron conforme transcurrió el tiempo hasta alcanzar el máximo a los 20 días (Tablas 2 a 5). En los microcosmos con atenuación el rango fue de $2,8 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^4$ NMP g⁻¹ a los 10 días; $4,4 \times 10^3$ a $>1,1 \times 10^5$ NMP g⁻¹ a los 20 días y $<3,0 \times 10^2$ a $2,1 \times 10^4$ NMP g⁻¹ a los 30 días. En los microcosmos con estimulación el rango fue de $2,0 \times 10^3$ a $2,9 \times 10^4$ NMP g⁻¹ a los 10 días; $4,4 \times 10^3$ a $>1,1 \times 10^5$ NMP g⁻¹ a los 20 días y $3,6 \times 10^2$ a $4,6 \times 10^4$ NMP g⁻¹ a los 30 días.

El índice de germinación en los suelos contaminados con ARA se incrementó con el tiempo hasta alcanzar el máximo a los 30 días (Tablas 6 a 9). En los microcosmos con atenuación el rango fue de 0 a 4,24% al inicio; 1,51 a 24,65% a los 10 días; 0,35 a 49,04% a los 20 días y 1,35 a 75,03% a los 30 días. En los microcosmos con estimulación el rango fue de 0 a 4,42% al inicio; 2,82 a 32,72% a los 10 días; 7,82 a 62,99% a los 20 días y 1,89 a 88,87% a los 30 días.

El nivel de toxicidad en los suelos contaminados con ARA fue severo a los 0, 10 y 20 días en los microcosmos con atenuación y bioestimulación. A los 30 días el nivel de toxicidad fue moderado en T3, T7 y T14 con atenuación y fue bajo en T3 y T7. En el resto de tratamientos con atenuación y bioestimulación el nivel de toxicidad fue severo, incluyendo T14 con bioestimulación (Tablas 6 a 9).



Figura 11. Suelo contaminado con aceite residual automotriz en taller de reparación de vehículos terrestres en la provincia de Chiclayo, Lambayeque, 2018.



Figura 12. Suelo contaminado en centro de expendio de aceite en Chiclayo, Lambayeque, 2018.



Figura 13. Suelo contaminado en centro de expendio de aceite en Chiclayo, Lambayeque, 2018.

Tabla 1

Área contaminada con aceite residual automotriz y nivel de fitotoxicidad del suelo de los talleres de reparación de vehículos terrestres y centros de expendio de aceite automotriz en la provincia de Chiclayo, 2018

Taller	Rubro	Distrito	Área contaminada (%)	IG*** (%)	Fitotoxicidad (nivel)
1	T.R*	Chiclayo	50	0,00	Severo
2	T.R	Chiclayo	35	4,24	Severo
3	C.E**	Chiclayo	40	1,59	Severo
4	T.R	Chiclayo	75	3,18	Severo
5	T.R	José Leonardo Ortiz	50	1,59	Severo
6	T.R	José Leonardo Ortiz	30	1,24	Severo
7	T.R	José Leonardo Ortiz	50	3,72	Severo
8	T.R	José Leonardo Ortiz	30	3,36	Severo
9	T.R y C.E	Chiclayo	45	1,06	Severo
10	T.R	Chiclayo	80	0,53	Severo
11	T.R	José Leonardo Ortiz	60	0,53	Severo
12	T.R	José Leonardo Ortiz	30	3,55	Severo
13	T.R	José Leonardo Ortiz	40	0,53	Severo
14	T.R y C.E	Chiclayo	55	0,35	Severo
15	T.R y C.E	Chiclayo	40	1,59	Severo

*Taller de reparación **Centro de expendio ***Índice de germinación de *Raphanus sativus* L.

Tabla 2

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz al momento del establecimiento del microcosmos

Tratamientos	Atenuación		Bioestimulación	
	Lectura**	NMP g ^{-1**}	Lectura	NMP g ⁻¹
T1	222	3,5 x 10 ³	212	2,7 x 10 ³
T2	201	1,4 x 10 ³	200	9,1 x 10 ²
T3	222	3,5 x 10 ³	222	3,5 x 10 ³
T4	222	3,5 x 10 ³	222	3,5 x 10 ³
T5	101	7,2 x 10 ²	110	7,3 x 10 ²
T6	132	2,4 x 10 ³	112	1,5 x 10 ³
T7	133	2,9 x 10 ³	212	2,7 x 10 ³
T8	200	9,1 x 10 ²	221	2,8 x 10 ³
T9	222	3,5 x 10 ³	222	3,5 x 10 ³
T10	100	3,6 x 10 ²	101	7,2 x 10 ²
T11	222	3,5 x 10 ³	222	3,5 x 10 ³
T12	220	2,1 x 10 ³	222	3,5 x 10 ³
T13	121	1,5 x 10 ³	201	1,4 x 10 ³
T14	210	1,5 x 10 ³	221	2,8 x 10 ³
T15	200	9,1 x 10 ²	211	2,0 x 10 ³

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 24 horas

Tabla 3

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclásticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 10 días en microcosmos

Tratamientos	Atenuación		Bioestimulación	
	Lectura**	NMP g ^{-1**}	Lectura	NMP g ⁻¹
T1	310	7,5 x 10 ³	321	1,5 x 10 ⁴
T2	302	6,4 x 10 ³	302	6,4 x 10 ³
T3	311	7,5 x 10 ³	322	2,1 x 10 ⁴
T4	223	4,2 x 10 ³	223	4,2 x 10 ³
T5	221	2,8 x 10 ³	211	2,0 x 10 ³
T6	222	3,5 x 10 ³	232	4,4 x 10 ³
T7	213	3,4 x 10 ³	232	4,4 x 10 ³
T8	321	1,5 x 10 ⁴	321	1,5 x 10 ⁴
T9	322	2,1 x 10 ⁴	322	2,1 x 10 ⁴
T10	133	2,9 x 10 ³	133	2,9 x 10 ³
T11	223	3,4 x 10 ³	223	4,2 x 10 ³
T12	330	2,4 x 10 ⁴	323	2,9 x 10 ⁴
T13	231	3,6 x 10 ³	222	3,5 x 10 ³
T14	312	1,2 x 10 ⁴	312	1,2 x 10 ⁴
T15	301	3,9 x 10 ³	232	4,4 x 10 ³

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 10 días

Tabla 4

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclásticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 20 días en microcosmos

Tratamientos	Atenuación		Bioestimulación	
	Lectura **	NMP g ^{-1**}	Lectura	NMP g ⁻¹
T1	323	2,9 x 10 ⁴	322	2,1 x 10 ⁴
T2	313	1,6 x 10 ⁴	323	2,9 x 10 ⁴
T3	313	1,6 x 10 ⁴	332	1,1 x 10 ⁵
T4	312	1,2 x 10 ⁴	322	2,1 x 10 ⁴
T5	332	1,1 x 10 ⁵	323	2,9 x 10 ⁴
T6	333	>1,1 x 10 ⁵	322	2,1 x 10 ⁴
T7	232	4,4 x 10 ³	332	1,1 x 10 ⁵
T8	332	1,1 x 10 ⁵	322	2,1 x 10 ⁴
T9	333	>1,1 x 10 ⁵	333	>1,1 x 10 ⁵
T10	232	4,4 x 10 ³	223	4,2 x 10 ³
T11	232	4,4 x 10 ³	233	5,3 x 10 ³
T12	333	>1,1 x 10 ⁵	332	1,1 x 10 ⁵
T13	332	1,1 x 10 ⁵	322	2,1 x 10 ⁴
T14	332	1,1 x 10 ⁵	323	2,9 x 10 ⁴
T15	323	2,9 x 10 ⁴	322	4,4 x 10 ³

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 10 días

Tabla 5

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclásticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 30 días en microcosmos

Tratamientos	Atenuación		Bioestimulación	
	Lectura**	NMP g ^{-1**}	Lectura	NMP g ⁻¹
T1	212	2,7 x 10 ³	321	1,5 x 10 ⁴
T2	111	1,1 x 10 ³	132	2,4 x 10 ³
T3	121	1,5 x 10 ³	201	1,4 x 10 ³
T4	221	2,8 x 10 ³	311	7,5 x 10 ³
T5	110	7,3 x 10 ²	231	3,6 x 10 ³
T6	220	2,1 x 10 ³	331	4,6 x 10 ⁴
T7	202	2,0 x 10 ³	321	1,5 x 10 ⁴
T8	000	<3,0 x 10 ²	100	3,6 x 10 ²
T9	211	2,0 x 10 ³	021	9,3 x 10 ²
T10	121	1,5 x 10 ³	132	2,4 x 10 ³
T11	211	2,0 x 10 ³	111	1,1 x 10 ³
T12	210	1,5 x 10 ³	210	1,5 x 10 ³
T13	322	2,1 x 10 ⁴	221	2,8 x 10 ³
T14	232	4,4 x 10 ³	212	2,7 x 10 ³
T15	100	3,6 x 10 ²	011	6,1 x 10 ²

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 10 días

Tabla 6

Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz al momento del establecimiento del microcosmos

Tratamientos	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L.			
	Atenuación		Bioestimulación	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)
T1	0,00	Severo	2,77	Severo
T2	4,24	Severo	1,95	Severo
T3	1,59	Severo	0,53	Severo
T4	3,18	Severo	0,71	Severo
T5	1,59	Severo	1,40	Severo
T6	1,24	Severo	3,37	Severo
T7	3,72	Severo	4,42	Severo
T8	3,36	Severo	2,66	Severo
T9	1,06	Severo	0,35	Severo
T10	0,53	Severo	0,35	Severo
T11	0,53	Severo	0,71	Severo
T12	3,55	Severo	1,24	Severo
T13	0,53	Severo	0,00	Severo
T14	0,35	Severo	1,59	Severo
T15	1,59	Severo	0,00	Severo

Tabla 7
Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 10 días en microcosmos

Tratamientos	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L.			
	Atenuación		Bioestimulación	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)
T1	7,72	Severo	2,82	Severo
T2	8,39	Severo	18,11	Severo
T3	9,73	Severo	16,27	Severo
T4	22,15	Severo	32,72	Severo
T5	16,61	Severo	4,53	Severo
T6	25,32	Severo	31,21	Severo
T7	17,62	Severo	10,23	Severo
T8	1,51	Severo	9,73	Severo
T9	15,60	Severo	15,60	Severo
T10	24,65	Severo	17,29	Severo
T11	11,00	Severo	4,20	Severo
T12	2,68	Severo	3,02	Severo
T13	3,02	Severo	3,52	Severo
T14	19,63	Severo	17,95	Severo
T15	7,04	Severo	4,86	Severo

Tabla 8

Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 20 días en microcosmos

Tratamientos	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L.			
	Atenuación		Bioestimulación	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)
T1	13,14	Severo	8,17	Severo
T2	16,79	Severo	44,71	Severo
T3	26,77	Severo	35,48	Severo
T4	33,48	Severo	62,99	Moderado
T5	16,87	Severo	12,28	Severo
T6	45,76	Severo	39,74	Severo
T7	28,21	Severo	33,83	Severo
T8	0,35	Severo	8,20	Severo
T9	13,75	Severo	16,81	Severo
T10	45,24	Severo	23,88	Severo
T11	19,62	Severo	12,20	Severo
T12	6,22	Severo	12,05	Severo
T13	19,08	Severo	7,82	Severo
T14	49,04	Severo	23,24	Severo
T15	14,90	Severo	8,01	Severo

Tabla 9

Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 30 días en microcosmos

Tratamientos	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L.			
	Atenuación		Bioestimulación	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)
T1	8,77	Severo	4,00	Severo
T2	2,29	Severo	17,97	Severo
T3	51,21	Moderado	82,33	Bajo
T4	38,23	Severo	46,78	Severo
T5	16,47	Severo	16,22	Severo
T6	16,36	Severo	23,10	Severo
T7	75,03	Moderado	88,87	Bajo
T8	1,35	Severo	1,89	Severo
T9	13,11	Severo	4,73	Severo
T10	21,01	Severo	33,65	Severo
T11	5,45	Severo	27,97	Severo
T12	12,03	Severo	2,98	Severo
T13	41,49	Severo	26,07	Severo
T14	60,70	Moderado	42,41	Severo
T15	22,03	Severo	4,73	Severo

Los microcosmos seleccionados para el aislamiento de los consorcios microbianos fueron T3, T7 y T14 con atenuación y bioestimulación (Tabla 10), obteniéndose tres microorganismos en T3 y T7 y seis microorganismos en T14 (Tabla 11). En los consorcios microbianos aerobios se identificaron las bacterias *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp., las levaduras *Candida* spp. y los hongos filamentosos *Aspergillus* sp. y *Paecilomyces* sp. En T7 se identificaron bacterias, en T3 bacterias y hongos filamentosos y en T14 bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Tabla 12).

4.3 Comparación del efecto de tres consorcios microbianos aerobios en la biorremediación de suelo contaminado

El suelo del taller de reparación de vehículos terrestres de Chiclayo (T1) con 50% del área del establecimiento contaminado con ARA presentó 147 340 mg kg⁻¹ de aceites y grasas, las fracciones media (14 443 mg kg⁻¹) y pesada (15 240 mg kg⁻¹) de hidrocarburos, microorganismos hidrocarbonoclasticos (7,5 x 10³ NMP g⁻¹) y un nivel severo de toxicidad (Tablas 13, 14, anexo E). La mezcla de este suelo con 50% de pajilla de arroz (v/v) presentó 32 119 mg kg⁻¹ de aceites y grasas; 4,3 x 10³ NMP g⁻¹ de microorganismos hidrocarbonoclasticos y un nivel severo de toxicidad (Tabla 15, anexo F).

Los microorganismos hidrocarbonoclasticos se incrementaron durante la biorremediación, alcanzando los valores máximos a los 60 días (Tabla 16, anexo G). El NMP osciló entre 4,1 x 10⁴ a >1,1 x 10⁵ en los tratamientos con los consorcios microbianos, superando a los testigos químico (3,4 x 10³ NMP/100 mL) y absoluto (2,1 x 10³ NMP/100 mL).

El IG de las semillas de rabanito en el suelo durante el proceso de biorremediación se incrementó (Tabla 17) en el suelo de todos los tratamientos. En los microcosmos con los consorcios microbianos + fertilizante químico el IG fue de 24,01 a 32,42% a los 30 días; 51,90 a 68,85% a los 60 días y 74,16 a 94,35% a los 90 días. En el testigo químico (T2) el IG fue de 23, 19% a los 30 días; 36,67% a los 60 días y 53,20% a los 60 días. En el testigo absoluto (T1) el IG fue de 7,79% a los 30 días; 31,59% a los 60 días y 46,02% a los 90 días.

Tabla 10

Características del suelo de tres microcosmos seleccionados a los 30 días

Tratamientos	NMP g ⁻¹	Nivel de fitotoxicidad
	Hidrocarbonoclasticos	
T3 - Atenuación	1,5 x 10 ³	Moderado
T3 - Bioestimulación	1,4 x 10 ³	Bajo
T7 -Atenuación	2,0 x 10 ³	Moderado
T7 - Bioestimulación	1,5 x 10 ⁴	Bajo
T14 - Atenuación	4,4 x 10 ³	Moderado
T14 - Bioestimulación	2,7 x 10 ³	Severo

Tabla 11

Cultivos de microorganismos hidrocarbonoclasticos aerobios aislados de microcosmos seleccionados

Tratamiento	Número de cultivos de microorganismos			
	Bacterias	Levaduras	Mohos	Total
T3 – Atenuación	1	0	1	2
T3 - Bioestimulación	1	0	0	1
T7 - Atenuación	1	0	0	1
T7 - Bioestimulación	2	0	0	2
T14 - Atenuación	3	1	0	4
T14 - Bioestimulación	0	1	1	2

Tabla 12

Géneros identificados en consorcios de microorganismos hidrocarbonoclásticos aerobios

Consortios microbianos	Géneros
T3 – Atenuación	<i>Acinetobacter</i> sp.1, <i>Paecilomyces</i> sp.
T3 - Bioestimulación	<i>Pseudomonas</i> sp.1
T7 - Atenuación	<i>Pseudomonas</i> sp.2
T7 - Bioestimulación	<i>Pseudomonas</i> sp.3, <i>Acinetobacter</i> sp.2
T14 - Atenuación	<i>Pseudomonas</i> spp. 4 y 5, <i>Acinetobacter</i> sp.3, <i>Candida</i> sp.1
T14 - Bioestimulación	<i>Candida</i> sp.2, <i>Aspergillus</i> sp.

El análisis de varianza de los promedios del IG demostró alta significancia a los 30, 60 y 90 días de la biorremediación (Anexo H). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró que los mayores IG correspondieron a T4 a los 30, 60 y 90 días (Tabla 18).

El nivel de toxicidad del suelo durante la biorremediación disminuyó de severo a bajo con el consorcio microbiano 7 + fertilizante químico (T4) y consorcio microbiano 14 + fertilizante químico (T5); severo a moderado con el consorcio microbiano 3 + fertilizante químico (T3) y el testigo fertilizante químico (T2) y se mantuvo en bajo en el testigo absoluto, T1 (Tabla 17, anexo I).

El suelo biorremediado con los consorcios microbianos 7 y 14 presentó un nivel bajo de fitotoxicidad a los 90 días; no obstante, entre ellos el IG fue de 94,35% con el consorcio microbiano 7 y 80,82% con el consorcio microbiano 14 (Tabla 17). El suelo biorremediado con el consorcio 7 más fertilizante químico presentó 32 119 mg kg⁻¹ de aceites y grasas al inicio del proceso y 4 430 mg kg⁻¹ después de 90 días, disminución correspondiente a 86,21% de eficiencia en la biorremediación (Tabla 19, anexo J).

Tabla 13

Características químicas y microbiológicas del suelo contaminado con aceite residual automotriz en Lambayeque, 2018

Características	Valores	Métodos
Aceites y grasas (mg kg ⁻¹)	147 340	SMEWW-APHA-AWWA-WEF
Hidrocarburos F2 o fracción media > C10 – C28 (mg kg ⁻¹)	14 443	EPA 8015C
Hidrocarburos F3 o fracción pesada > C28 – C40 (mg kg ⁻¹)	15 240	EPA 8015C
Hidrocarburos F1 o fracción ligera > C10 – C28 (mg kg ⁻¹)	<19	EPA 8015C
Microorganismos hidrocarbonoclásticos (NMPg ⁻¹)	7,5 x 10 ³	Número más Probable

Tabla 14

Nivel de toxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz en Lambayeque, 2018

Características	Valores
Promedio elongación radicular	4.67 mm
Porcentaje relativo de germinación (PGR)	12.50 %
Crecimiento relativo de la radícula (CRR)	3.61 mm
Índice de germinación (IG)	0.45 %
Nivel de fitotoxicidad	Severo

Tabla 15

Características del suelo contaminado con aceite residual automotriz al momento del establecimiento del microcosmos en la etapa de biorremediación

Características	Valores
Aceites y grasas	32 119 mg kg ⁻¹
Microorganismos hidrocarbonoclasticos (NMP/100g)	4,3 x10 ³
Índice de germinación (%IG)	4,15 %
Nivel de fitotoxicidad	Severo

Tabla 16

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz durante 90 días de biorremediación

Tratamientos	NMP/100mL		
	30 días	60 días	90 días
Testigo absoluto (T1)	$1,4 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$
Testigo N:P (T2)	$1,8 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$
Consorcio microbiano 3 + N:P (T3)	$3,5 \times 10^3$	$4,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$
Consorcio microbiano 7 + N:P (T4)	$1,3 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$
Consorcio microbiano 14 + N:P (T5)	$8,1 \times 10^3$	$5,9 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 17

*Índice de germinación de *Raphanus sativus* L. y nivel de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz durante 90 días de biorremediación*

Tratamientos	30 días		60 días		90 días	
	IG (%)	Fitotoxicidad	IG (%)	Fitotoxicidad	IG (%)	Fitotoxicidad
Testigo absoluto (T1)	7,79	Severo	31,59	Severo	46,02	Severo
Testigo N:P (T2)	23,19	Severo	36,67	Severo	53,20	Moderado
Consorcio microbiano 3 + N:P (T3)	24,01	Severo	51,90	Moderado	74,16	Moderado
Consorcio microbiano 7 + N:P (T4)	32,42	Severo	68,85	Moderado	94,35	Bajo
Consorcio microbiano 14 + N:P (T5)	23,83	Severo	59,97	Moderado	80,82	Bajo

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 18

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de las medias del índice de germinación de Raphanus sativus L. durante la biorremediación de suelo contaminado

Tratamientos	IG/días*					
	30 días	Sign.*	60 días	Sig.*	90 días	Sign*
Testigo absoluto (T1)	7,79	c	31,59	e	46,02	e
Testigo N:P (T2)	23,19	b	36,67	d	53,20	d
Consorcio microbiano 3 + N:P (T3)	24,01	b	51,90	c	74,16	c
Consorcio microbiano 7 + N:P (T4)	32,42	a	68,85	a	94,35	a
Consorcio microbiano 14 + N:P (T5)	23,83	b	59,97	b	80,82	b

*0 días = IG 4,15%

Tabla 19

Características del suelo biorremediado con consorcio microbiano 7 más fertilizante químico

Características	Días			
	0	30	60	90
Microorganismos hidrocarbonoclásticos (NMP/100g)	$7,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$
Índice de germinación (%)	4,15	32,42	68,85	94,35
Nivel de toxicidad	Severo	Severo	Moderado	Bajo
Aceites y grasas (mg kg ⁻¹)	32 119	-----	-----	4 430
Eficiencia de la biorremediación (%)	-----	-----	-----	86,21

V. DISCUSIÓN

El índice de germinación (0 a 4,24%) de las semillas de rabanito en el suelo contaminado con ARA demostró un nivel severo de fitotoxicidad, por cuanto en los establecimientos de procedencia se acumulan residuos peligrosos como los aceites residuales, además de líquido de frenos, filtros y baterías (Abdulsalam et al., 2012; Ogumbayo et al., 2012). El ARA tiene cadenas largas (C16 – C36) de hidrocarburos saturados y más de 75% de alcanos cíclicos (Ibrahim, 2016), compuestos que impactan el suelo y agua y afectan a los seres vivos (Das & Chandran, 2011). Los suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo, HTP, son caracterizados como residuos peligrosos y deben ser remediados (Sari, Trihadiningrum & Matuzahroh, 2019).

Los HTP son contaminantes omnipresentes por lo que los microorganismos degradadores no solo se encuentran en los ambientes impactados sino en cualquier emplazamiento (Solanas, 2009). La presencia de microorganismos hidrocarbonoclásticos en los microcosmos con el suelo contaminado con ARA fue demostrada previamente por Abdulsalam et al. (2012), Ogumbayo et al. (2012) e Ibrahim (2016). En estos ambientes la comunidad microbiana se adapta a los contaminantes, facilitándose el aislamiento y caracterización de bacterias y hongos hidrocarbonoclásticos (Xenia & Refugio, 2016).

El incremento de los microorganismos hidrocarbonoclásticos evidenció la utilización del ARA como fuente de carbono y energía (Abdulsalam et al. 2012; Agamuthu et al., 2013). La disminución posterior de la población microbiana se explica por la escasez de nutrientes nitrógeno o fósforo requeridos para la asimilación del carbono (Ferreira et al., 2013), acumulación de residuos tóxicos por los microorganismos o por la permanencia de un menor número de microorganismos capaces de degradar los hidrocarburos persistentes, de alto peso molecular y más recalcitrantes a la biodegradación (Bento et al., 2005).

El incremento en el índice de germinación de las semillas de rabanito y la disminución de toxicidad del suelo contaminado con ARA observados conforme transcurrió el tiempo denotó la actividad de los microorganismos hidrocarbonoclásticos que utilizaron los HTP como fuente de carbono y energía

(Jain et al., 2011). El proceso biodegradativo es más rápido en aerobiosis que en anaerobiosis y los HTP son transformados gradualmente en intermediarios del metabolismo que son utilizados en la síntesis de la biomasa celular, para el desarrollo microbiano o pueden ser mineralizados (Yuniati, 2017).

La atenuación se fundamenta en la capacidad natural del suelo para degradar un contaminante (Bento et al., 2005), mediante mecanismos físicos, químicos y biológicos sin intervención humana (Solanas, 2009). La biodegradación de los HTP ocurre por atenuación natural o por las tecnologías de bioestimulación o bioaumentación (Bento et al., 2005); no obstante la mayor efectividad se observa con la bioestimulación (Piñón et al., 2018).

En la presente investigación con la bioestimulación se alcanzó mayor efectividad en la disminución de la toxicidad del suelo de los microcosmos en comparación con la atenuación natural. De igual manera, Piñón et al. (2018) determinaron mayor tasa de biodegradación con la bioestimulación, seguido de la atenuación y bioaumentación. Por el contrario, Bento et al. (2005) demostraron que la mayor degradación de las fracciones ligeras (72%) y pesada (75%) del HTP correspondió a la bioaumentación y la atenuación natural fue más efectiva que la bioestimulación durante la biorremediación de un suelo contaminado con diésel.

La mayor disminución de la toxicidad del suelo con la bioestimulación no se observó en T14, tratamiento en el que la toxicidad fue moderada con atenuación y severa con bioestimulación. Resultados aparentemente contradictorios también fueron reportados por Mariano, Kataoka, Angelis y Bonotto (2007). Estos investigadores determinaron que la mayor (57,8%) eficiencia en la remoción del TPH con N:P y consorcios microbianos (T3) no correspondió con el mayor grado de mineralización del contaminante alcanzado con N:P + surfactante + consorcios bacterianos (T1), diferencias atribuidas a rutas metabólicas diferentes entre la microbiota de los tratamientos. En T3 la mayoría de los hidrocarburos fueron transformados, pero no alcanzaron el máximo grado de biodegradación evidenciado por el dióxido de carbono producido.

La identificación de bacterias, levaduras y mohos en los microcosmos después de 30 días coincide con el reporte de Milic et al. (2009), quienes cuantificaron estos microorganismos durante la biorremediación de un suelo contaminado con crudo de petróleo y derivados de la refinería y concluyeron que una comunidad microbiana se estabiliza durante el proceso biodegradativo. Según Xenia y Refugio

(2016) los microorganismos implicados en la biodegradación de los hidrocarburos son bacterias, hongos, levaduras y protozoos. En la naturaleza los microorganismos generalmente se encuentran formando consorcios que interactúan sinérgicamente, incrementando la remoción de los contaminantes.

Los géneros identificados en los consorcios de microorganismos aerobios fueron reportados previamente como hidrocarbonoclásticos, considerándose a *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. (Abu & Atu, 2008), *Paecilomyces* spp. (Jain et al., 2011), *Candida* spp. (Das & Chandran, 2011) y *Aspergillus* spp. (Xenia & Refugio, 2016).

La biodegradación del petróleo por consorcios microbianos es mayor que la alcanzada con un solo microorganismo (Jain et al., 2011; Ogumbayo et al., 2012; Ibrahim, 2016). Por esta razón, en la biorremediación de suelo contaminado con ARA se utilizaron consorcios de tres a seis microorganismos. Al respecto, Burghal, Mudaffar y Mahdi (2015) inocularon un consorcio de seis cultivos de actinomicetos seleccionados en el suelo impactado por HTP en forma crónica, concluyendo que los consorcios presentan la ventaja de una mayor capacidad degradativa por el efecto sinérgico y el cometabolismo.

Los consorcios microbianos pueden estar constituidos por dos (Ogumbayo et al., 2012), tres (Pinto et al., 2012) e inclusive seis especies (Bento et al., 2005). La ventaja de los consorcios microbianos es la variedad de genes, responsables de la actividad catabólica y el efecto sinérgico de estos genes es benéfico para la biodegradación (Xu et al., 2018).

El suelo del taller de reparación de vehículos terrestres (T1) presentó aceites y grasas en una concentración superior al rango de 276 a 38 592 mgkg⁻¹ reportado en establecimientos contaminados con ARA (Vineetha & Shibu, 2012; Abdulsalam et al., 2012). Respecto a los hidrocarburos totales de petróleo las concentraciones de las fracción F2 o media y F3 o pesada de los HTP sobrepasaron los límites establecidos por los estándares de calidad ambiental, ECA (Ministerio del Ambiente, 2017).

La mezcla de suelo contaminado con ARA y pajilla de arroz presentó una concentración inicial de 32 119 mgkg⁻¹ de aceites y grasas, similar a 32 027 mgkg⁻¹ de un suelo al inicio de la biorremediación con 20N:10P:10K y bacterias exógenas en condiciones de biorreactores aerobios (Abdulsalam et al., 2012). Estos investigadores concluyeron que la concentración del TPH puede resultar mínima en el ARA, pero no

así la de aceites y grasas, habiendo cuantificado 32 027 mg kg⁻¹ de aceites y grasas y 169 mg kg⁻¹ de TPH en un suelo contaminado con ARA. Esta diferencia significativa se explica por la reducción en los enlaces carbono – hidrógeno (C – H), que ocasiona pérdida de la viscosidad. Por tanto, para monitorear la degradación del ARA se prefiere la concentración de aceites y grasas porque el método utilizado para la cuantificación no es afectado por la alteración de los enlaces C – H (Abu & Atu, 2008).

La inoculación de los consorcios microbianos y aplicación de N y P correspondió a las técnicas de bioaumentación y bioestimulación, respectivamente, coincidiendo con Mariano et al. (2007), Burghal et al., (2015) y Piñón et al. (2018). La inoculación de microorganismos previamente caracterizados y seleccionados por su capacidad hidrocarbonoclástica se denomina bioaumentación (Das & Chandran, 2011). Con esta tecnología se acelera la degradación de los HTP (Xenia & Refugio, 2016), como lo demostró Mariano et al. (2017) en la biorremediación de un suelo contaminado con diésel.

La adición de sustratos orgánicos, vitaminas, oxígeno u otro compuesto que estimule la actividad hidrocarbonoclástica se denomina bioestimulación (Agamuthu et al., 2013). El nitrógeno y fósforo son los nutrientes principales requeridos para la utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Mariano et al., 2007; Agamuthu et al., 2013). Al respecto, Abdulsalam et al. (2012) investigaron la biorremediación de un suelo contaminado con ARA y un rango de TPH de 192 a 326 mg kg⁻¹ y después de 70 días con la aplicación de 20N:10P:10K alcanzaron 72% de reducción del TPH en comparación con 56% en el testigo con agua.

El incremento de los microorganismos hidrocarbonoclásticos hasta un máximo (60 días) y posterior disminución coincide con las investigaciones de Milic et al. (2009), Abdulsalam et al. (2012) y Agamuthu et al. (2013). Al respecto, Milic et al. (2009) cuantificaron el mayor número de microorganismos entre los 49 y 96 días del proceso de biorremediación y en simultáneo también se alcanzó la mayor disminución del TPH, determinando que a los 63 días el 50% de los hidrocarburos habían sido degradados. Por su parte, Agamuthu et al. (2013) cuantificaron el mayor número de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclásticas a los 70 días de la biorremediación de un suelo contaminado (10%) con ARA.

El tiempo de 90 días requerido para la biorremediación de suelo contaminado con ARA es inferior a 98 días (Agamuthu et al., 2013), pero superior a 70 días

reportado por Abdulsalam et al. (2012). El menor tiempo reportado por estos investigadores es explicado por el uso de biorreactores con aireación, condición que favorece en forma significativa la biodegradación de los HTP (Abu & Atu, 2008).

Abdulsalam et al. (2012) investigaron en biorreactores la biorremediación aplicando bioestimulación y bioaumentación en un suelo contaminado con ARA y después de 70 días determinaron 68% de reducción los aceites y grasas, correspondiente a 61% de disminución del TPH (169 mg kg⁻¹ al inicio hasta 66 mg kg⁻¹ al final). La concentración inicial de aceites y grasas fue de 32 027 mg kg⁻¹, la final de 10 115 mg kg⁻¹ y el proceso se caracterizó por un periodo rápido de disminución (59%) de los aceites y grasas los primeros 28 días y más lento las 6 semanas restantes. De igual manera, se observó la mayor generación de dióxido de carbono a los 26 días y mayor población de bacterias hidrocarbonoclásticas a los 35 días.

VI. CONCLUSIONES

6.1. En los talleres de reparación de vehículos terrestres y centros de expendio en la provincia de Chiclayo, el suelo contaminado con aceite residual automotriz (ARA) presentó un nivel severo de toxicidad en la germinación de semillas de *Raphanus sativus* L. “rabanito”.

6.2. En los microcosmos con menor toxicidad se seleccionaron tres consorcios de microorganismos hidrocarbonoclásticos aerobios constituidos por bacterias (T7), bacterias y hongos filamentosos (T3) y bacterias, levaduras y hongos filamentosos (T14).

6.3. En los consorcios de microorganismos hidrocarbonoclásticos aerobios seleccionados se identificaron *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Candida* spp., *Aspergillus* sp. y *Paecilomyces* sp.

6.4. Los tres consorcios microbianos aerobios aceleraron e incrementaron la biorremediación del suelo contaminado con ARA, alcanzándose un nivel bajos de fitotoxicidad a los 90 días con los consorcios microbianos T7 y T14.

VII. RECOMENDACIONES

Identificar a nivel molecular las especies de los microorganismos de los consorcios T3, T7 y T14.

Determinar el efecto de los consorcios microbianos aerobios seleccionados en la biorremediación de suelo contaminado con ARA a nivel de planta piloto.

Cuantificar las fracciones F1 ligera, F2 media y F3 pesada y aromáticos en el suelo biorremediado con los consorcios de microorganismos aerobios seleccionados.

Establecer el uso de equipos de protección primaria (EPP) para el personal que trabaja en los talleres de reparación de vehículos terrestres.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulsalam, S, Adefila, S., Bugaje, I. & Ibrahim, S. (2012). Bioremediation of soil contaminated with used motor oil in a closed system. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 3(12), 1-7. doi: 10.4172/2155-6199.1000172
- Abu, G. & Atu, N. (2008). An investigation of oxygen limitation in microcosm models in the bioremediation of a typical Niger Delta soil ecosystem impacted with crude oil. *Jasem Issn*, 12(1), 13-22. Recuperado de: www.bioline.org.br/ja
- Agamuthu, P., Tan, Y. & Fauziah, S. (2013). Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes. *Procedia Environmental Sciences*, 18, 694–702. doi: 10.1016/j.proenv.2013.04.094
- Alexander, M. (1994). *Introducción a la Microbiología del Suelo*. México: Editorial AGT SA.
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. (2da ed.). Chiclayo, Perú: Editorial Ciencia
- Anza, H., Orantes, P., González, R., Ruíz, A., Espinoza, E., Martínez, R., García, Carlos & Vera, P. (2016). Bioremediation of soils contaminated with automotive oil used by byopile system. *Espacio I + D Innovación más Desarrollo*, 12, 46-71. Recuperado de: https://www.espacioimasd.unach.mx/articulos/num12/pdf/bioremediation_of_soils.pdf
- Benites, J. & Flores, S. (2015). *Efecto del estiércoles de cuy, porcino y vacuno en la biorremediación de suelos contaminado con Hidrocarburos de diésel en terrarios* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Bento, F., Camargo, F., Okeke, B. & Frankenberger, W. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96, 1049-1055. Recuperado de: www.sciencedirect.com
- Burghal, A., Mudaffar, N. & Mahdi, K. (2015). *Ex situ* bioremediation of soil contaminated with crude oil by use of actinomycetes consortia for process bioaugmentation. *European Journal of Experimental Biology*, 5(5), 24-30. Recuperado de: www.pelagiaresearchlibrary

- Cando, M. (2011). *Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.
- Contreras, H. & Carreño, C. (2018). *Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado*. *Revista de Investigación Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(1), 27-33. doi: 10.25127/ucni.v1i1.269.
- Das, N. & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 1-13. doi: 10.4061/2011/94110
- Dirección General de Salud y Ambiente, DIGESA. (2006). Manual de Difusión Técnica N° 01: Gestión de los Residuos Peligrosos en el Perú. Recuperado de: <http://www.digesa.minsa.gob.pe/publicaciones/descargas/MANUAL%2520TEC>
- Díaz, Z. & Sánchez, H. (2008). *Temperatura y tiempo de fermentación en la elaboración de encurtidos de hortalizas con cepas nativas de Lactobacillus plantarum y Leuconostoc mesenteroides ssp.* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú
- Ferreira, T., Santos, F. & Pessoa, F. (2013). Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 21-28. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188499920130
- García, N. & Aguirre, M. (2015). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. *Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 641-652. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/>
- García, M. & Peralta, M. (2008). Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7(1), 1-12. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382008000100001&script>
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación* (6ta ed.). México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. & Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed). Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins.

- Ibrahim, H. (2016). Biodegradation of used engine oil by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil. *Biotechnology*, 6(226), 1-13. doi: 10.1007/s13205-016-0540-5
- Izquierdo, A. (2013). *Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales*. (tesis de doctorado). Universidad de Barcelona, España.
- Jain, P., Gupta, V., Gaur, R., Lowry, M., Jaroli, D. & Chauhan, U. (2011). Biorremediation of petroleum oil contaminated soil and water. *Research Journal of Environmental toxicology*, 5(1), 1-26. doi: 10.3923/rjet.2011.1.26
- León, S. (2016). *Evaluación del potencial fitorremediador de dos especies vegetales Paspalum millegrana L. y Bidens pilosa L. para remediar suelos contaminados por hidrocarburos provenientes de la lavadora y lubricadora Marifer, Cantón Zamora*. (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Loja, Zamora, Ecuador.
- Mena, M. (2009). *Estándares de gestión medio ambiental en talleres de mecánica automotriz*. (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Milic, J., Beskoski, V., Ilíc, M., Ali, S., Cvijovic, G. & Vrvic, M. (2009), Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74 (4), 455–460. doi: 10.2298/JSC0904455M
- Ministerio del Ambiente, (2017). Decreto Supremo N° 011 - 2017 – MINAM del 2 de diciembre de 2017 por el cual se aprueban los estándares de calidad ambiental (ECA) para suelo. Lima: Ministerio del Ambiente de Perú.
- Ogumbayo, A., Bello, R. & Nwagbara, U. (2012). Bioremediation of engine oil contaminated site. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, 3(3), 483-489. Recuperado de: jateas.scholarlinkresearch.org
- Ortiz, R., Cram, S. & Sommer, I. (2012). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelos de la llanura aluvial baja del estado de Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*, 28(2), 131-144. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v28n2/v28n2a3.pdf>

- Pérez, J., Vigueras, S., Gómez, O. & Calva, G. (2015). Degradación microbiana con BFNA de hidrocarburos aromáticos por bioaumentación en biopilas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46, 416-423. Recuperado de: <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/degradaci%25C3%25B3n->
- Pérez, G., Morales, P. & Haza, A. (2016). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (I): toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(1), 1-15. doi: 10.5209/rev_RCCV.2016.v10.n1.51869
- Pinto, A., Geraldés, A., de Angelis, D. & Bonotto, D. (2007). Laboratory study on the Bioremediation of diésel oil contaminated soil from a petrol sattion. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 346-353. Recuperado de: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822007000200030&script=sci_ar ttext
- Piñón H., Lardizabal D., Zavala F., Hernández D., Muñoz L., Rivera B. & Nevárez G. (2018). Labratory-scale biodegradation of fuel oil N°.6 in contaminated soils by autochthonous bacteria. *Web of Sciece*, 5, 80-98. doi: 10.5772/intechopen.70350
- Ponce, D. (2014). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Quiceno, E. & Ríos, L. (2014). Potenciadores en el proceso de remoción biológica de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHAS). *Hechos Microbiológicos*, 5(1), 36-50. Recuperado de: <http://www.udea.edu.co/hm>
- Ramírez, M. (2014). *Microorganismos degradadores de hidrocarburos de petróleo aislados de la rizósfera de manglar del estado de Campeche y su potencial en la biorremediación*. (tesis de doctorado). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México
- Robledo, R. (2013). *Manual de educación ambiental para el manejo adecuado de los aceites usados en la ciudad de Riobamba*. (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Rodríguez, C. (2012). *Producción de biogás a partir del bagazo cervecero*. (tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Salleh, A., Ghazali, F., Rahman, R. & Basri, M. (2003). Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 411-425. Recuperado de: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/11330>

- Sari, G., Trihadiningrum, Y. & Matuzahroh, N. (2019). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in crude oil contaminated soil from wonocolo public oilfields using aerobic composting with yard waste and rumen residue amendments. *Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems*, 7(3), 482-492. doi: 10.13044/j.sdewes.d7.0262
- Saucedo, B., Montaña, N., Márquez, L. & Sánchez, Y. (2016). Bioestimulación de suelo impactado con 45 000 ppm de aceite residual automotriz y fitorremediación con *Zea mays* y *Burkholderia cepacia* y/o *Rhizobium etli*. *Journal of the selva Andina Research Society*, 7(2), 86-94. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=361346796006>
- Solanas, A. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. *Estudios en la Zona no satura del suelo*, 11, 1-8.
- Suntaxi, J. (2012). *Propuestas para el manejo de fluidos contaminantes de un taller automotriz en el sector sur del distrito metropolitano de Quito*. (tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Latacunga, Ecuador.
- Villarreal, S., Balagurusamy, N., Rodríguez, R., Aguilar, C. & Morlett, J. (2014). Biodegradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos contaminantes del medio ambiente y alimentos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(11), 28-39. Recuperado de: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%252011/5.pdf>
- Viñas, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Barcelona, España.
- Vineetha, V. & Shibu, K. (2012). Bioremediation of oil contaminated soil. Recuperado de: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/6477954/>
- Xenia, M. & Refugio, R. (2016). Microorganisms Metabolism during Bioremediation of Oil Contaminated Soils. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 7(2), 1-6. doi: 10.4172/2155-6199.1000340
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H. & Yu, H. (2018). Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-11. doi 10.3389/fmicb.2018.02885
- Yuniati, M. (2017). Biorremediación of petroleum-contaminated soil. *Earth and Environmental Science*, 118, 1-7. doi: 10.1088/1755-1315/118/1/012063

ANEXO A

Temperaturas mínima, media y máxima durante la selección de consorcios de microorganismos hidrocarbonoclasticos en los microcosmos con menor toxicidad

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
01/10/2018	15	20	22
02/10/2018	16	20	22
03/10/2018	16	21	23
04/10/2018	16	20	21
05/10/2018	16	21	23
06/10/2018	16	21	23
07/10/2018	16	21	23
08/10/2018	16	20	22
09/10/2018	15	19	21
10/10/2018	15	19	21
11/10/2018	15	20	22
12/10/2018	16	21	23
13/10/2018	16	22	24
14/10/2018	16	21	23
15/10/2018	16	22	24
16/10/2018	15	22	24
17/10/2018	16	21	23
18/10/2018	15	19	22
19/10/2018	16	21	23
20/10/2018	16	18	20
21/10/2018	15	18	22
22/10/2018	15	18	22
23/10/2018	16	19	22
24/10/2018	16	21	23
25/10/2018	16	21	24
26/10/2018	16	21	24
27/10/2018	16	21	24
28/10/2018	15	21	24
29/10/2018	16	21	24
30/10/2018	16	21	24

**Temperaturas mínima, media y máxima durante biorremediación de suelo
contaminado con aceite residual automotriz**

01/12/2018	16	21	23
02/12/2018	16	22	24
03/12/2018	16	22	24
04/12/2018	16	21	23
05/12/2018	16	21	23
06/12/2018	16	21	23
07/12/2018	16	22	24
08/12/2018	17	22	24
09/12/2018	17	22	24
10/12/2018	16	21	23
11/12/2018	17	22	23
12/12/2018	16	21	23
13/12/2018	16	21	23
14/12/2018	16	22	24
15/12/2018	16	20	23
16/12/2018	16	20	23
17/12/2018	16	21	24
18/12/2018	16	23	25
19/12/2018	16	21	23
20/12/2018	16	18	20
21/12/2018	15	18	22
22/12/2018	15	18	22
23/12/2018	16	19	22
24/12/2018	16	21	23
25/12/2018	16	21	24
26/12/2018	16	21	23
27/12/2018	16	22	24
28/12/2018	16	21	23
29/12/2018	16	20	22
30/12/2018	16	20	22
01/01/2019	27	27	33
02/01/2019	24	25	32
03/01/2019	24	26	32
04/01/2019	24	23	31
05/01/2019	24	25	32
06/01/2019	24	27	31
07/01/2019	23	24	32
08/01/2019	23	25	31
09/01/2019	23	25	30
10/01/2019	24	27	31

11/01/2019	24	25	31
12/01/2019	24	25	32
13/01/2019	24	27	31
14/01/2019	24	27	29
15/01/2019	24	26	31
16/01/2019	25	27	31
17/01/2019	25	27	34
18/01/2019	25	27	32
19/01/2019	24	27	32
20/01/2019	25	27	31
21/01/2019	24	26	31
22/01/2019	24	27	32
23/01/2019	24	28	31
24/01/2019	24	28	31
25/01/2019	23	27	31
26/01/2019	25	29	32
27/01/2019	24	28	32
28/01/2019	24	29	33
29/01/2019	24	27	30
30/01/2019	24	27	30
31/01/2019	23	27	31
01/02/2019	23	28	32
02/02/2019	23	28	33
03/02/2019	24	29	33
04/02/2019	25	29	33
05/02/2019	24	27	30
06/02/2019	24	28	32
07/02/2019	24	28	32
08/02/2019	24	29	33
09/02/2019	23	26	29
10/02/2019	25	28	31
11/02/2019	25	28	30
12/02/2019	25	28	30
13/02/2019	23	27	30
14/02/2019	24	29	33
15/02/2019	24	29	33
16/02/2019	24	28	32
17/02/2019	23	27	31
18/02/2019	24	28	32
19/02/2019	24	28	32
20/02/2019	24	28	32
21/02/2019	25	28	30

22/02/2019	25	28	31
23/02/2019	24	27	29
24/02/2019	24	29	33
25/02/2019	24	29	34
26/02/2019	24	29	34
27/02/2019	24	29	33
28/02/2019	23	27	31
01/03/2019	23	27	31
02/03/2019	24	29	33
03/03/2019	24	26	31
04/03/2019	24	27	32
05/03/2019	24	28	31
06/03/2019	24	28	31
07/03/2019	23	27	31
08/03/2019	25	29	32
09/03/2019	24	28	32
10/03/2019	24	29	33
11/03/2019	24	27	30
12/03/2019	24	27	30
13/03/2019	23	27	31
14/03/2019	23	28	32
15/03/2019	23	28	33
16/03/2019	24	29	33
17/03/2019	25	29	33
18/03/2019	24	27	30
19/03/2019	24	28	32
20/03/2019	24	28	32
21/03/2019	24	29	33
22/03/2019	23	26	29
23/03/2019	25	28	31
24/03/2019	25	28	30
25/03/2019	25	28	30
26/03/2019	23	27	30
27/03/2019	24	29	33
28/03/2019	24	29	33
29/03/2019	24	28	32
30/03/2019	23	27	31

ANEXO B**Caldo Bushnell Hass (en Contreras y Carreño, 2018)**

KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	1,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$	1,0
MgSO_4	0,20
Cl_2Ca	0,02
FeCl_3	0,005
Agua destilada	1000mL
pH	7,0

ANEXO C

Cálculo del número más probable (NMP) para número de microorganismos hidrocarbonoclasticos

Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

$$\text{NMP}/100 \text{ mL} = (\text{Tabla NMP}/100 \text{ mL}) \times 10^V$$

Donde:

(Tabla NMP/100 mL) = valor dado en la tabla según el código.

V = volumen de muestra de la primera dilución

Ejemplo:

$$\begin{aligned}
 3 \ 0 \ 1 &= 64 \times 10^2 \\
 &= 64 \times 100 \\
 &= 6\ 400 \\
 &= 6,4 \times 10^3
 \end{aligned}$$

ANEXO D

Cálculo del fertilizante químico para la biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz

Se requiere aplicar 10 UN y 1UP (100C:10N:1P)

a) Cálculo de FDA (18%N – 46%)

$$100 \text{ kg FDA} \rightarrow 46 \text{ U/P}$$

$$x \rightarrow 1 \text{ U/P}$$

$$x = 2,174 \text{ kg FDA} \cdot \text{ha}^{-1}$$

$$x = 0,217 \text{ g FDA} \cdot \text{m}^2$$

Adición por terrario:

$$0,217 \text{ g FDA} \rightarrow 1 \text{ m}^2$$

$$x \rightarrow 0,112 \text{ m}^2$$

$x = 0,024 \text{ g FDA}$

$$100 \text{ kg FDA} \rightarrow 18 \text{ U/N}$$

$$0,000024 \text{ kg FDA} \rightarrow x$$

$$x = 0,000024 \text{ kg N}$$

$x = 0,004 \text{ g N FDA}$

b) Cálculo de Urea (46% N)

$$100 \text{ kg urea} \rightarrow 46 \text{ U/N}$$

$$x \rightarrow 10 \text{ U/N}$$

$$x = 21,739 \text{ kg urea} \cdot \text{ha}^{-1}$$

$$x = 2,1739 \text{ g urea} \cdot \text{m}^2$$

Adición por terrario:

$$2,174 \text{ g urea} \rightarrow 1 \text{ m}^2$$

$$x \rightarrow 0,112 \text{ m}^2$$

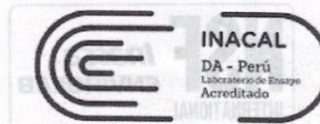
$x = 0,239 \text{ g N}$

$$0,239 \text{ g N (urea)} - 0,004 \text{ g N (FDA)}$$

$x = 0,235 \text{ g urea}$

ANEXO E

Análisis químico del suelo



Registro N° LE - 001

Información General

Matriz: Suelo
 Solicitud de Análisis: Cotización N° 39172 (Nov-395)
 Muestreado por: Cliente
 Procedencia: Taller de Reparación Automotriz

Identificación de Laboratorio: S-0001547740
 Tipo de Muestra: Suelo
 Identificación de Muestra: Suelo
 Fecha y Hora de Muestreo: 2018-11-18 11:00
 Fecha de Recepción de la Muestra: 2018-11-21
 Fecha de Inicio de análisis: 2018-11-27

Análisis	Resultado	Unidad
Química		
*Aceites y Grasas. Suelo, Sedimento y Lodo, SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 5520 E, 22nd Ed 2012. Extraction Method for Sludge Samples		
Aceites Y Grasas	147 340	mg/Kg
*PAH's. Suelo, EPA Method 8270 E, Revised 6, February 2017. Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography /Mass Spectrometry (GC/MS)		
Naphthalene	N.C.(<0,049)	mg/Kg
Acenaphthylene	N.C.(<0,053)	mg/Kg
Acenaphthene	N.C.(<0,052)	mg/Kg
Fluorene	0,11	mg/Kg
Phenanthrene	1,2	mg/Kg
Anthracene	N.C.(<0,049)	mg/Kg
Fluoranthene	0,12	mg/Kg
Pyrene	0,53	mg/Kg
Benzo(a)Anthracene	N.C.(<0,051)	mg/Kg
Chrysene	0,43	mg/Kg
Benzo(b)Fluoranthene	N.C.(<0,051)	mg/Kg
Benzo(k)Fluoranthene	0,052	mg/Kg
Benzo(a)Pyrene	N.C.(<0,050)	mg/Kg
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	N.C.(<0,052)	mg/Kg
Dibenzo(a,h)Anthracene	N.C.(<0,053)	mg/Kg
Benzo(ghi)Perylene	0,055	mg/Kg
Hidrocarburos (C10-C28). Suelo, Sedimento y Lodo EPA Method 8015C, Revision 3, February 2007. Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography		
Hidrocarburos (C10-C28)	14 443	mg/Kg
Hidrocarburos (C28-C40). Suelo, Sedimento y Lodo EPA Method 8015C, Revision 3, February 2007. Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography		
Hidrocarburos (C28-C40)	15 240	mg/Kg
Hidrocarburos, Fracción 1 (C6-C10). Suelo. EPA Method 8015 C, Revision 3, February 2007 Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography		
Hidrocarburos (C6-C10)	N.C.(<19)	mg/Kg

Notas de Ensayo:

N.C.: Significa que el resultado es No Cuantificable y es menor al Límite de Cuantificación indicado en el paréntesis.

FI20181204184716

J-00321178

pág 2 de 3

El presente informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente excepto con la aprobación por escrito de NSF Inassa. Solamente los documentos originales son válidos y NSF Inassa no se responsabiliza por la validez de las copias. Estos resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto ni la autorización de uso de la Marca NSF. Los resultados se refieren únicamente a los elementos analizados, en la condición de muestra recibida por el laboratorio.

ANEXO F

Análisis Inicial del suelo



Información General

Matriz: Suelo

Solicitud de Análisis: Cotización N° 40466 (Mar-114)

Muestreado por: Cliente

Procedencia: Chiclayo - Lambayeque

Identificación de Laboratorio: S-0001583265
 Tipo de Muestra: Suelo
 Identificación de Muestra: Muestra N° 1
 Fecha y Hora de Muestreo: 2019-03-07 10:30
 Fecha de Recepción de la Muestra: 2019-03-11
 Fecha de Inicio de análisis: 2019-03-25

Análisis	Resultado	Unidad
Química		
# Material extraíble al hexano. Suelo, Sedimento y Lodo. EPA 9071B; Rev.2; 1998. n-Hexane Extractable Material (HEM) for Sludge, Sediment, and Solid Samples.		
Material extraíble al hexano (AyG)	9 076	mg/Kg

Identificación de Laboratorio: S-0001583266
 Tipo de Muestra: Suelo
 Identificación de Muestra: Muestra N° 2
 Fecha y Hora de Muestreo: 2019-03-08 10:30

Análisis	Resultado	Unidad
Química		
# Material extraíble al hexano. Suelo, Sedimento y Lodo. EPA 9071B; Rev.2; 1998. n-Hexane Extractable Material (HEM) for Sludge, Sediment, and Solid Samples.		
Material extraíble al hexano (AyG)	17 825	mg/Kg

Identificación de Laboratorio: S-0001583267
 Tipo de Muestra: Suelo
 Identificación de Muestra: Muestra N° 3
 Fecha y Hora de Muestreo: 2019-03-09 10:30
 Fecha de Recepción de la Muestra: 2019-03-11
 Fecha de Inicio de análisis: 2019-03-25

Análisis	Resultado	Unidad
Química		
# Material extraíble al hexano. Suelo, Sedimento y Lodo. EPA 9071B; Rev.2; 1998. n-Hexane Extractable Material (HEM) for Sludge, Sediment, and Solid Samples.		
Material extraíble al hexano (AyG)	32 119	mg/Kg

Nota(s) del Informe Final:

Resultados expresados en base seca.

Este Informe anula al Informe de Ensayo N° EPSF J-00329953 y N° de Serie FI20190325101351.

ANEXO G

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 30 días en microcosmos en la etapa de biorremediación

Tratamiento	R1		R2		R3	
	Lectura**	NMP g ^{-1**}	Lectura	NPM g ⁻¹	Lectura	NMP g ⁻¹
Testigo absoluto (T1)	121	1,5 x 10 ³	111	1,1 x 10 ³	121	1,5 x 10 ³
Testigo químico (T2)	121	1,5 x 10 ³	122	2,0 x 10 ³	211	2,0 x 10 ³
Consorcio microbiano 1 + N:P (T3)	233	5,3 x 10 ³	213	3,4 x 10 ³	113	1,9 x 10 ³
Consorcio microbiano 2 + N:P (T4)	233	5,3 x 10 ³	233	5,3 x 10 ³	323	2,9 x 10 ⁴
Consorcio microbiano 3 + N:P (T5)	313	1,6 x 10 ⁴	323	2,9 x 10 ³	223	5,3 x 10 ³

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 72 horas

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 60 días en microcosmos en la etapa de biorremediación

Tratamiento	R1		R2		R3	
	Lectura **	NMP g ^{-1**}	Lectura	NPM g ⁻¹	Lectura	NMP g ⁻¹
Testigo absoluto (T1)	221	2,8 x 10 ³	210	1,5 x 10 ³	122	2,0 x 10 ³
Testigo químico (T2)	232	4,4 x 10 ³	222	3,5 x 10 ³	132	2,4 x 10 ³
Consorcio microbiano 1 + N:P (T3)	302	6,4 x 10 ³	233	5,3 x 10 ³	332	1,1 x 10 ⁵
Consorcio microbiano 2 + N:P (T4)	332	1,1 x 10 ⁵	333	>1,1 x 10 ⁵	333	>1,1 x 10 ⁵
Consorcio microbiano 3 + N:P (T5)	322	2,1 x 10 ⁴	331	4,6 x 10 ⁴	332	1,1 x 10 ⁵

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 72 horas

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 90 días en microcosmos en la etapa de biorremediación

Tratamiento	R1		R2		R3	
	Lectura**	NMP g ^{-1**}	Lectura	NPM g ⁻¹	Lectura	NMP g ⁻¹
Testigo absoluto (T1)	220	2,1 x 10 ³	022	1,2 x 10 ³	033	1,9 x 10 ³
Testigo químico (T2)	133	2,9 x 10 ³	300	2,3 x 10 ³	223	4,2 x 10 ³
Consorcio microbiano 1 + N:P (T3)	233	5,3 x 10 ³	301	3,9 x 10 ³	133	2,9 x 10 ³
Consorcio microbiano 2 + N:P (T4)	033	1,9 x 10 ³	123	2,4 x 10 ³	233	5,3 x 10 ³
Consorcio microbiano 3 + N:P (T5)	133	2,9 x 10 ³	313	1,6 x 10 ⁴	323	2,9 x 10 ⁴

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 72 horas

ANEXO H

Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 30 días del establecimiento del microcosmos en la etapa de biorremediación

Tratamiento	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L. “rabanito”					
	R1		R2		R3	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (%)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (nivel)
Testigo absoluto (T1)	7,55	Severo	6,97	Severo	8,84	Severo
Testigo abiótico (T2)	23,32	Severo	23,46	Severo	22,78	Severo
Consorcio microbiano 1 + N:P (T3)	24,57	Severo	23,31	Severo	24,16	Severo
Consorcio microbiano 2 + N:P (T4)	32,78	Severo	33,15	Severo	31,33	Severo
Consorcio microbiano 3 + N:P (T5)	24,46	Severo	23,44	Severo	23,60	Severo

Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 60 días del establecimiento del microcosmos en la etapa de biorremediación

Tratamiento	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L. "rabanito"					
	R1		R2		R3	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (%)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (nivel)
Testigo absoluto (T1)	31,04	Severo	31,27	Severo	32,45	Severo
Testigo abiótico (T2)	36,08	Severo	36,43	Severo	37,51	Severo
Consorcio microbiano 1 + N:P (T3)	52,69	Moderado	51,62	Moderado	51,40	Moderado
Consorcio microbiano 2 + N:P (T4)	68,06	Moderado	69,13	Moderado	69,36	Moderado
Consorcio microbiano 3 + N:P (T5)	59,24	Moderado	60,90	Moderado	59,77	Moderado

Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con aceite residual automotriz después de 90 días del establecimiento del microcosmos en la etapa de biorremediación

Tratamiento	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L. "rabanito"					
	R1		R2		R3	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (%)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (nivel)
Testigo absoluto (T1)	43,25	Severo	45,02	Severo	44,80	Severo
Testigo abiótico (T2)	52,47	Moderado	53,69	Moderado	53,45	Moderado
Consorcio microbiano 1 + N:P (T3)	74,54	Moderado	74,93	Moderado	73,03	Moderado
Consorcio microbiano 2 + N:P (T4)	93,57	Bajo	94,44	Bajo	95,03	Bajo
Consorcio microbiano 3 + N:P (T5)	80,78	Bajo	80,00	Moderado	81,75	Bajo

ANEXO I

Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianza y análisis de varianza del índice de germinación de *Raphanus sativus* L. a los 30 días

Prueba de normalidad

Índice de germinación a los 30 días

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo Absoluto	0,954	3	0,588
Testigo Químico	0,897	3	0,375
Consorcio 1 + N:P	0,961	3	0,620
Consorcio 2 + N:P	0,895	3	0,370
Consorcio 3 + N:P	0,864	3	0,280

Prueba de homogeneidad de varianzas

Índice de germinación a los 30 días

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,255	4	10	0,349

ANOVA de un factor

Índice de germinación a los 30 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	957,332	4	239,333	445,779	0,000
Dentro de grupos	5,369	10	0,537		
Total	962,700	14			

Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianza y análisis de varianza del índice de germinación de *Raphanus sativus* L. a los 60 días

Prueba de normalidad

Índice de germinación a los 60 días

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo Absoluto	0,869	3	0,291
Testigo Químico	0,920	3	0,453
Consorsio 1 + N:P	0,874	3	0,306
Consorsio 2 + N:P	0,878	3	0,318
Consorsio 3 + N:P	0,958	3	0,607

Prueba de homogeneidad de varianzas

Índice de germinación a los 60 días

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,54	4	10	0,994

ANOVA de un factor

Índice de germinación a los 60 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2924,371	4	731,093	1303,521	0,000
Dentro de grupos	5,609	10	0,561		
Total	2929,979	14			

Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianza y análisis de varianza del índice de germinación de *Raphanus sativus* L. a los 90 días

Prueba de normalidad

Índice de germinación a los 90 días

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo Absoluto	0,842	3	0,218
Testigo Químico	0,891	3	0,357
Consorsio 1 + N:P	0,896	3	0,373
Consorsio 2 + N:P	0,988	3	0,789
Consorsio 3 + N:P	0,996	3	0,880

Prueba de homogeneidad de varianzas

Índice de germinación a los 90 días

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,336	4	10	0,847

ANOVA de un factor

Índice de germinación a los 90 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4996,519	4	1249,130	1704,847	0,000
Dentro de grupos	7,327	10	0,733		
Total	5003,846	14			

ANEXO J

Concentración de aceites y grasas al final de la biorremediación



INFORME DE ENSAYO N° 1-07050/19

Pág. 1/1

Solicitante : SIPION DIAZ, SANDRA LISBETH
 Domicilio legal : Tuman Centro Mz. 37 Lt. 8 - Chiclayo - Lambayeque - Lambayeque
 Producto declarado : SUELO
 Cantidad de Muestras para el Ensayo : 1 muestra x 900 g
 Muestra proporcionada por el solicitante
 Identificación de la muestra : PTO1 LAMBAYEQUE
 SUELO CON PETROLEO
 FECHA Y HORA DE MUESTREO: 2019-07-25 / 09:00
 Forma de Presentación : En bolsa ziplock, cerrada y conservada a temperatura ambiente
 Fecha de recepción : 2019 - 07 - 30
 Fecha de inicio del ensayo : 2019 - 08 - 01
 Fecha de término del ensayo : 2019 - 08 - 01
 Ensayo realizado en : Laboratorio Ambiental
 Identificado con : H/S 19007937 (EXMA-11224-2019)
 Validez del documento : Este documento es válido solo para las muestras descritas

Ensayo	LD	Unidad	Resultado
Aceites y Grasas	0,50	g/100g	4,43

LD: Límite de detección

MÉTODO

Aceites y Grasas: SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 5520 E. 23rd Ed.2017. Oil and grease. Extraction method for sludge samples.

OBSERVACIONES

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin la autorización escrita de CERPER S.A.

Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de la calidad de la entidad que lo produce.

Callao, 05 de agosto de 2019
AM

CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.

ING. ROSA PALOMINO LOO
 C.I.P. 40302
 COORDINADOR DE LABORATORIOS